

**GROUP OF BASE SEQUENCE FOR HLA-DR TYPING AND HLA-DR TYPING METHOD USING THE SAME BASE SEQUENCE****Publication number:** JP6090757 (A)**Publication date:** 1994-04-05**Inventor(s):** OBATA BUNYA; KASHIWAGI NOBORU; ABE AKIO; MIYAKOSHI TERUICHI**Applicant(s):** KITASATO INST; MITSUI PETROCHEMICAL IND**Classification:****- international:** C07H21/04; C12N15/09; C12N15/10; C12N15/11; C12Q1/68; G01N33/53; C07H21/00; C12N15/09; C12N15/10; C12N15/11; C12Q1/68; G01N33/53; (IPC1-7): C12N15/11; C07H21/04; C12N15/10; C12Q1/68; G01N33/53**- European:****Application number:** JP19920224432 19920824**Priority number(s):** JP19920224432 19920824; JP19910212472 19910823**Abstract of JP 6090757 (A)**

**PURPOSE:**To provide the subject new oligonucleotide probe useful for gene-typing of HLA-DR antigen.

**CONSTITUTION:**An oligonucleotide probe for an oligonucleotide nucleic acid base sequence, e.g. A3 (GCCGGGTGGA CAACTACT), F10 (TTATGGACGC GTCTTTCCA), A1416 (AGCGCACGTT CTCCTCCTG), K1406 (GCACGTTCTC CTCCTGGTT), F30 (GCTCGTCTTC CAGGAAGTC) or F44 (GAGCAGAAGC GGGCCGCG) capable of specifically crossing with a base sequence of an antigen-decision part of DR antigen, e.g. OA3, OF10, OA1416, OK1406, OF30 or OF44. This probe can be obtained by synthesis using an automated DNA synthesizer made by Applied Biosystem Co. and subsequent purification according to the denaturated polyacrylamide gel electrophoresis method.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

**Family list****1** application(s) for: **JP6090757 (A)****1 GROUP OF BASE SEQUENCE FOR HLA-DR TYPING AND HLA-DR TYPING METHOD USING THE SAME BASE SEQUENCE****Inventor:** OBATA BUNYA ; KASHIWAGI  
NOBORU (+2)**Applicant:** KITASATO INST ; MITSUI  
PETROCHEMICAL IND**EC:****IPC:** C07H21/04; C12N15/09; C12N15/10; (+14)**Publication info:** JP6090757 (A) — 1994-04-05

---

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-90757

(43)公開日 平成6年(1994)4月5日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 N 15/11	ZNA			
C 0 7 H 21/04				
C 1 2 N 15/10				
C 1 2 Q 1/68		A 7823-4B		
		8931-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数21(全 33 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-224432

(22)出願日 平成4年(1992)8月24日

(31)優先権主張番号 特願平3-212472

(32)優先日 平3(1991)8月23日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 390027214

社団法人北里研究所

東京都港区白金5丁目9番1号

(71)出願人 000005887

三井石油化学工業株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(72)発明者 小幡 文弥

神奈川県相模原市大野台六丁目13番7号

(72)発明者 柏木 登

東京都新宿区西早稲田二丁目10番4号

(72)発明者 阿部 章夫

東京都港区白金五丁目7番17号

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 HLA-DRタイピング用塩基配列群とそれを用いた  
ピング法

HLA-DRタイ

(57)【要約】

【構成】 HLA-DR抗原分子のサブタイプの識別をも精密に実施することを可能とする特定の配列を有するオリゴヌクレオチドプローブ群、およびオリゴヌクレオチドプローブ群を含む検査試薬および器具を含む遺伝子タイピングキット、さらに該試薬を用いる新規なタイピング法

【効果】 本発明により提供されるオリゴヌクレオチドプローブ群は、HLA-DR抗原をコードする遺伝子の遺伝子型を明確に型分けすることが可能であり、該オリゴヌクレオチドプローブを使用することにより、従来は型分け不可能であった遺伝子型を型分け可能とした。また公知のオリゴヌクレオチドプローブを併せて使用することにより、日本人の場合には、その97%と高率でHLA-DR抗原の遺伝子型を型分け可能とした。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の配列番号1乃至配列番号8で表わされる核酸塩基配列の1種または2種以上を検出するためのHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用のオリゴヌクレオチドプローブ。

OA3: 配列番号1記載の核酸塩基配列  
OF10: 配列番号2記載の核酸塩基配列  
OA1416: 配列番号3記載の核酸塩基配列  
OK1406: 配列番号6記載の核酸塩基配列  
OF30: 配列番号4記載の核酸塩基配列  
OF44: 配列番号5記載の核酸塩基配列  
OF45: 配列番号6記載の核酸塩基配列  
OF863: 配列番号7記載の核酸塩基配列  
OF851: 配列番号8記載の核酸塩基配列

【請求項2】 下記の配列番号9乃至配列番号16で表わされる核酸塩基配列の1種または2種以上を含むHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用のオリゴヌクレオチドプローブ。

A3: 配列番号9記載の核酸塩基配列  
F10: 配列番号10記載の核酸塩基配列  
A1416: 配列番号11記載の核酸塩基配列  
K1406: 配列番号6記載の核酸塩基配列  
F30: 配列番号12記載の核酸塩基配列  
F44: 配列番号13記載の核酸塩基配列  
F45: 配列番号14記載の核酸塩基配列  
F863: 配列番号15記載の核酸塩基配列  
F851: 配列番号16記載の核酸塩基配列

【請求項3】 請求項1記載の核酸塩基配列に加えて下記の配列番号17乃至配列番号40で表わされる核酸塩基配列の1種または2種以上をも検出することを特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用のオリゴヌクレオチドプローブ。

OF1: 配列番号17記載の核酸塩基配列  
OF2: 配列番号18記載の核酸塩基配列  
OF3: 配列番号19記載の核酸塩基配列  
OF4: 配列番号20記載の核酸塩基配列  
OF7: 配列番号21記載の核酸塩基配列  
OF8: 配列番号22記載の核酸塩基配列  
OF9: 配列番号23記載の核酸塩基配列  
OF11: 配列番号24記載の核酸塩基配列  
OF13: 配列番号25記載の核酸塩基配列  
OF52: 配列番号26記載の核酸塩基配列  
OF52c: 配列番号27記載の核酸塩基配列  
OF53: 配列番号28記載の核酸塩基配列  
OF120: 配列番号29記載の核酸塩基配列  
OF121: 配列番号30記載の核酸塩基配列  
OF122: 配列番号31記載の核酸塩基配列  
OF123: 配列番号32記載の核酸塩基配列  
OF142: 配列番号33記載の核酸塩基配列  
OF143: 配列番号34記載の核酸塩基配列

2

OF22: 配列番号35記載の核酸塩基配列  
OF29: 配列番号36記載の核酸塩基配列  
OF42: 配列番号37記載の核酸塩基配列  
OF46: 配列番号38記載の核酸塩基配列  
OF141: 配列番号39記載の核酸塩基配列  
OF158: 配列番号40記載の核酸塩基配列

【請求項4】 請求項2記載のオリゴヌクレオチドプローブに加えて下記の配列番号41乃至配列番号64の核酸塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドプローブの1種または2種以上をも含むHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用のオリゴヌクレオチドプローブ。

F1: 配列番号41記載の核酸塩基配列  
F2: 配列番号42記載の核酸塩基配列  
F3: 配列番号43記載の核酸塩基配列  
F4: 配列番号44記載の核酸塩基配列  
F7: 配列番号45記載の核酸塩基配列  
F8: 配列番号46記載の核酸塩基配列  
F9: 配列番号47記載の核酸塩基配列  
F11: 配列番号48記載の核酸塩基配列  
F13: 配列番号49記載の核酸塩基配列  
F52: 配列番号50記載の核酸塩基配列  
F52c: 配列番号51記載の核酸塩基配列  
F53: 配列番号52記載の核酸塩基配列  
F120: 配列番号53記載の核酸塩基配列  
F121: 配列番号54記載の核酸塩基配列  
F122: 配列番号55記載の核酸塩基配列  
F123: 配列番号56記載の核酸塩基配列  
F142: 配列番号57記載の核酸塩基配列  
F143: 配列番号58記載の核酸塩基配列  
F22: 配列番号59記載の核酸塩基配列  
F29: 配列番号60記載の核酸塩基配列  
F42: 配列番号61記載の核酸塩基配列  
F46: 配列番号62記載の核酸塩基配列  
F141: 配列番号63記載の核酸塩基配列  
F158: 配列番号64記載の核酸塩基配列

【請求項5】 請求項1乃至4のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドプローブにおいて、少なくとも連続した10塩基の塩基配列を含むことを特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項6】 該オリゴヌクレオチドプローブがHLA-DRをコードする以外の染色体遺伝子、あるいは相補DNAの塩基配列に交雑しないことを特徴とする請求項2、4、5のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項7】 該オリゴヌクレオチドプローブがラジオアイソトープあるいは／および蛍光、発光、発色のいずれかの現象を起こし得る物質で標識されている、あるいは該物質により標識され得るように修飾されていることを特徴とする請求項2、4、5、6のいずれかに記載の

オリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項8】 該オリゴヌクレオチドプローブの少なくとも連続した10塩基の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドが膜などに固定されていることを特徴とする請求項2、4、5、6、7のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項9】 該オリゴヌクレオチドプローブを、人の血液あるいは／および口腔粘膜あるいは／および髪の毛あるいは／および爪を検体とした検出に用いることを特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピングの方法。

【請求項10】 HLA-DR抗原の遺伝子タイピングを行なうための検体からDNAを得る際に使用するものであって、塩化カリウム、塩化マグネシウム、ゼラチン、界面活性剤、プロテナーゼKを含むことを特徴とするトリス塩酸緩衝液。

【請求項11】 請求項9に記載の検体から得られるHLA-DR抗原をコードするDNAの内、少なくとも請求項1乃至6に記載のいずれかのオリゴヌクレオチドプローブの塩基配列を含む領域であり、且つ少なくともその一部がラジオアイソトープあるいは／および蛍光、発光、発色のいずれかの現象を起こし得る物質で標識されている、あるいは該物質により標識され得るように修飾されていることを特徴とする検体DNAおよび該DNAを含む溶液。

【請求項12】 HLA-DR抗原をコードするDNAの内、請求項1乃至6項のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの塩基配列を含む部分領域を下記の方法で増幅するHLA-DR抗原をコードするDNAの増幅方法。

(1) 耐熱性DNAポリメラーゼ存在下に、オリゴヌクレオチドプライマーと加熱処理によってデネイチャーしたHLA-DRをコードする染色体DNAをアニールし、  
(2) アニールしたDNAを加熱処理してプライマイクステンションさせ、(3) (1) および(2) のステップを繰り返す。

【請求項13】 増幅反応をラジオアイソトープおよび／あるいは蛍光、発光、発色のいずれかの現象を起こし得る物質で標識されている、あるいは該物質により標識され得るように修飾されているオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行うことを特徴とする請求項12に記載の増幅方法。

【請求項14】 該増幅反応をラジオアイソトープおよび／あるいは蛍光、発光、発色のいずれかの現象を起こし得る物質で標識されている、あるいは該物質により標識され得るように修飾されている核酸を用いて行ない請求項2、4、5、6、8のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションさせることを特徴とする請求項12または13に記載の増幅方法。

【請求項15】 該オリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列が配列番号65または配列番号66で表わされる請求項12または13に記載のオリゴヌクレオチドプライ

マー。

FPR1：配列番号65に記載の核酸塩基配列

DRβAMP1：配列番号66に記載の核酸塩基配列

【請求項16】 HLA-DR抗原の遺伝子タイピングを行なうためにDNA増幅反応を行なう際に使用するものであって、塩化カリウム、塩化マグネシウム、ゼラチン、dGTP、dCTP、dTTP、dATPおよび請求項15記載のオリゴヌクレオチドプライマーを含むことを特徴とするトリス・塩酸緩衝液。

【請求項17】 請求項8に記載のオリゴヌクレオチドプローブに請求項11に記載のDNAをハイブリダイゼーションさせる際に使用するものであって、テトラメチルアンモニウム、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム、デンハルト液、ドデシル硫酸ナトリウム、キャリアーDNAを含むことを特徴とするトリス塩酸緩衝液。

【請求項18】 請求項8に記載の物質に請求項11に記載のDNAをハイブリダイゼーションさせた後の洗浄に使用するものであって、テトラメチルアンモニウム、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム、デンハルト液、ドデシル硫酸ナトリウムを含むことを特徴とするトリス塩酸緩衝液。

【請求項19】 請求項1乃至8のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドプローブ、および請求項15に記載のオリゴヌクレオチドプライマー、請求項10、16、17、18のいずれかに記載の緩衝液の内、該オリゴヌクレオチドプローブを含む少なくとも2種類以上の構成物からなることを特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用の試薬キット。

【請求項20】 請求項19に記載の試薬キットに、遺伝子採取処理用、DNA増幅反応用、ハイブリダイゼーション用、ハイブリダイゼーション後の洗浄用、検出反応用チューブなどの必要な器具のすべてあるいは一部を加えて構成されることを特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用の検査キット。

【請求項21】 HLA-DR抗原の遺伝子タイピングを行なうに際し、請求項1乃至8のいずれかに記載の塩基配列で表わされるオリゴヌクレオチドプローブ群あるいは請求項19または20に記載の試薬キットあるいは検査キットを使用することを特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピングの方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒト白血球抗原の内DR抗原をコードする塩基配列を対象として行なわれる遺伝子タイピングを目的としたオリゴヌクレオチドプローブおよびこのオリゴヌクレオチドプローブを含む遺伝子タイピング用の試薬キットおよび使用する器具を含む遺伝子タイピングキット、さらにこれらを用いるヒト白血球抗原のDR抗原のタイピングの方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒト白血球抗原(HLAと省略する)のタイピング(型分け)は、臓器移植時の適合性の判定のみならず、疾病に対する個人の感受性の判定などにおいてその重要性が注目されている。わが国で頻度が高い腎移植の場合、血縁者がドナーとなる生体腎移植と、非血縁者からの死体腎移植とでは適合度が異なり、生体腎移植の方が良好な成績を納めている。このことは、従来の血清学的タイピングでは同定できないサブタイプが存在か、あるいは連鎖する他の遺伝子座が移植臓器の生着に影響している可能性を示唆するものである(代謝ハイライト、代謝25巻、臨時増刊号、山村雄一・吉利和監修、373-380頁、東京、中山書店発行)。

【0003】血清学的なタイピングは、特異性の明らかな抗血清を補体とともに検索対象のリンパ球に加えて、その細胞が傷害されるか否かを調べることによって行なわれている。この方法は簡便ではあるもののHLA抗原分子の抗原決定基の微妙な違いを識別できないため、サブタイプの存在を見落とす場合がある。また血清学的タイピングのもう一つの欠点は、血清学的タイピングでは未検出のHLAも存在していることである。この割合は日本人集団においては11%の比率を占めていると言われており(Baur M. P., Neugebauer M., Deppe Sigmund M., Lutton T., Mayer W. R., Albert E. D. ら、Histocompatibility testing 1984. Berlin, Springer-Verlag, 333頁 1984年)、これは決して少なくない数である。

【0004】しかしながら、非血縁者からの死体腎移植は多くなる一方で、従来の血清学的タイピングのみでは組織適合度を詳細に検討できないのが実状である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】HLA抗原はクラスI抗原とクラスII抗原に大別される。腎移植を例にあげるとクラスII抗原の一致が生着に重要であることが示唆されている。クラスII抗原はDR、DQ、DPの3種の抗原から構成されており、この中でも細胞膜表面上に最も多く発現されているDR抗原の適合性が重要とされている(雨宮浩、佐田正晴：相沢班腎移植と適合性の集計、昭和58年度科学研究費補助金〔総合研究(A)〕研究成果報告書：HLA-D領域の構成と機能、67頁、1984年)。

【0006】HLA-DR分子はヒトのクラスII分子の中で最も広く遺伝的な相違点を有している。即ち、18種のHLA-DR(DR1からDRw18まで)および2種のHLA-DRw(DRw52とDRw53)の血清学的な特異性がリンパ球テスト(CDL)の結果によって定義されており、また、26種のHLA-D(Dw1からDw26まで)の細胞特異性が混合リンパ球試験(MLR)の結果によって定義されている。(Bod

mer W. F., Alberet E., Bodmer J. G. ら、Histocompatibility Testing 1987年. New York, Springer-Verlag, 72頁 1989年)

HLA-DRAと-DRB遺伝子の塩基配列分析によりDRとほとんどのD特異性がDRβ鎖の第1ドメインをコードしているDRB遺伝子(B1、B3、B4、およびB5)の第2エクソン部によって決定されていることが判ってきた(Flomenberg, N., Histocompatibility Testing 1987. New York, Springer-Verlag, 532頁 1989年. Bodmer J. G., Marsh S. G. E. ら、Tissue Antigens 35巻 1頁 1990年)。さらに、塩基分析の結果からDRBアレルの5~6個の帰属不明な変異物の存在が明らかにされている。

(Bodmer J. G., Marsh S. G. E., Parham P. ら、Tissue Antigens 35巻 1頁 1990年. Abe A., Ito I., Ohkubo M. ら、Immunogenetics 30巻 422頁 1989年. Obata F., Abe A., Ohkubo M. ら、Hum Immunol 27巻 269頁 1990年. Petersdorf E. W., Griffith R. L., Erlich H. A. ら、Immunogenetics 32巻 96頁 1990年. Obata F., Ito I., Ito K. ら Immunogenetics 32巻 313頁 1990年)

これらの経緯を経て、免疫学的な手段によって検出される数以上のDRBアレルが知られるようになった。このような例としては、38種のDRB1アレル、4種のDRB3アレル、1種のDRB4アレル、および4種のDRB5アレルを挙げることができる。(Bodmer J. G., Marsh S. G. E., Parham P. ら、Tissue Antigens 35巻 1頁 1990年) 従って、HLA-DR抗原を精密に分類できるタイピング法が重要であることは言うまでもない。しかし、血清学的方法による従来法によっては、必ずしも満足されるタイピング結果が得られず、臓器移植など臨床的な観点からは従来の血清学的タイピングでは不十分と言わざるを得ない。

【0007】本発明は、血清学的タイピングでは識別困難なHLA-DR抗原分子を含めて、ほぼ全ての型を判別するための遺伝子タイピング用検査試薬を提供することを目的としている。さらに詳しくは、特にHLA-DR抗原分子のサブタイプの識別をも精密に実施することを可能とするオリゴヌクレオチドプローブ群、およびオリゴヌクレオチドプローブ群を含む検査試薬および器具

7

を含む遺伝子タイピングキット、さらに該試薬を用いる新規なタイピング法を提供することを目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、血清学的タイピングでは分けることができないHLA-DR抗原分子のサブタイプや血清学的にブランクと呼ばれるものも含めて、これらの抗原分子の各々のDNA塩基配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブ群に関するものである。

【0009】本発明者らはHLA-DR抗原、中でもブランクあるいはサブタイプを遺伝子レベルでタイピングすることができれば、現状以上に詳細なタイピングが可能であり、血清学的なタイピングの欠点をも解消できると考えるに至った。具体的には、DR抗原の遺伝的多型に富む領域に存在する個々の抗原決定部位に相当する特異的な塩基配列に特異的に交雑し得るオリゴヌクレオチドプローブを作製し、それに対して検体の遺伝子が交雑するか否かでDR抗原のタイプを決定する方法である。

【0010】そこで、このような考え方に従って、種々のDRBタイプの塩基配列を比較検討し、各々のタイプに固有の塩基配列を検索した。その結果、サブタイプおよび血清学的には判別困難な型を含めて塩基配列の違いが認められた。これらの塩基配列を基に、新規なオリゴヌクレオチドプローブを含めて、それぞれのDR抗原遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを作製した。また、さらにこれらのプローブを用いて遺伝子タイピングを行なった結果、ほぼ全てのDRBの型を判別することができた。

【0011】すなわち本発明は、下記の配列番号1乃至配列番号8で表わされる核酸塩基配列の1種または2種以上を検出するためのHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用のオリゴヌクレオチドプローブである。

OA3：配列番号1記載の核酸塩基配列

OF10：配列番号2記載の核酸塩基配列

OA1416：配列番号3記載の核酸塩基配列

OK1406：配列番号6記載の核酸塩基配列

OF30：配列番号4記載の核酸塩基配列

OF44：配列番号5記載の核酸塩基配列

OF45：配列番号6記載の核酸塩基配列

OF863：配列番号7記載の核酸塩基配列

OF851：配列番号8記載の核酸塩基配列

また、本発明は下記の配列番号9乃至配列番号16で表される核酸塩基配列の1種または2種以上を含むHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用のオリゴヌクレオチドプローブである。

A3：配列番号9記載の核酸塩基配列

F10：配列番号10記載の核酸塩基配列

A1416：配列番号11記載の核酸塩基配列

K1406：配列番号69記載の核酸塩基配列

F30：配列番号12記載の核酸塩基配列

8

F44：配列番号13記載の核酸塩基配列

F45：配列番号14記載の核酸塩基配列

F863：配列番号15記載の核酸塩基配列

F851：配列番号16記載の核酸塩基配列

また、本発明は配列番号1乃至配列番号8の核酸塩基配列の1種または2種以上に加えて下記の配列番号17乃至配列番号40で表わされる核酸塩基配列の1種または2種以上をも検出することを特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用のオリゴヌクレオチドプローブである。

OF1：配列番号17記載の核酸塩基配列

OF2：配列番号18記載の核酸塩基配列

OF3：配列番号19記載の核酸塩基配列

OF4：配列番号20記載の核酸塩基配列

OF7：配列番号21記載の核酸塩基配列

OF8：配列番号22記載の核酸塩基配列

OF9：配列番号23記載の核酸塩基配列

OF11：配列番号24記載の核酸塩基配列

OF13：配列番号25記載の核酸塩基配列

OF52：配列番号26記載の核酸塩基配列

OF52c：配列番号27記載の核酸塩基配列

OF53：配列番号28記載の核酸塩基配列

OF120：配列番号29記載の核酸塩基配列

OF121：配列番号30記載の核酸塩基配列

OF122：配列番号31記載の核酸塩基配列

OF123：配列番号32記載の核酸塩基配列

OF142：配列番号33記載の核酸塩基配列

OF143：配列番号34記載の核酸塩基配列

OF22：配列番号35記載の核酸塩基配列

OF29：配列番号36記載の核酸塩基配列

OF42：配列番号37記載の核酸塩基配列

OF46：配列番号38記載の核酸塩基配列

OF141：配列番号39記載の核酸塩基配列

OF158：配列番号40記載の核酸塩基配列

また、本発明は配列番号9乃至配列番号16の1種または2種以上のオリゴヌクレオチドプローブに加えて下記の配列番号41乃至配列番号64の核酸塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドプローブの1種または2種以上をも含むHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用のオリゴヌクレオチドプローブである。

F1：配列番号41記載の核酸塩基配列

F2：配列番号42記載の核酸塩基配列

F3：配列番号43記載の核酸塩基配列

F4：配列番号44記載の核酸塩基配列

F7：配列番号45記載の核酸塩基配列

F8：配列番号46記載の核酸塩基配列

F9：配列番号47記載の核酸塩基配列

F11：配列番号48記載の核酸塩基配列

F13：配列番号49記載の核酸塩基配列

F52：配列番号50記載の核酸塩基配列

9

F52c: 配列番号51記載の核酸塩基配列  
 F53: 配列番号52記載の核酸塩基配列  
 F120: 配列番号53記載の核酸塩基配列  
 F121: 配列番号54記載の核酸塩基配列  
 F122: 配列番号55記載の核酸塩基配列  
 F123: 配列番号56記載の核酸塩基配列  
 F142: 配列番号57記載の核酸塩基配列  
 F143: 配列番号58記載の核酸塩基配列  
 F22: 配列番号59記載の核酸塩基配列  
 F29: 配列番号60記載の核酸塩基配列  
 F42: 配列番号61記載の核酸塩基配列  
 F46: 配列番号62記載の核酸塩基配列  
 F141: 配列番号63記載の核酸塩基配列  
 F158: 配列番号64記載の核酸塩基配列

また、本発明は上記に記載のオリゴヌクレオチドプローブにおいて、少なくとも連続した10塩基の塩基配列を含むことを特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用のオリゴヌクレオチドプローブである。

【0012】また、本発明は上記に記載のオリゴヌクレオチドプローブがHLA-DRをコードする以外の染色体遺伝子、あるいは相補DNAの塩基配列に交雑しないことを特徴とする上記いずれかに記載のオリゴヌクレオチドプローブである。また、本発明は上記に記載のオリゴヌクレオチドプローブがラジオアイソトープあるいは/および蛍光、発光、発色のいずれかの現象を起こし得る物質で標識されている、あるいは該物質により標識され得るように修飾されていることを特徴とする、上記いずれかのオリゴヌクレオチドプローブである。

【0013】また、本発明は上記に記載のオリゴヌクレオチドプローブの少なくとも連続した10塩基の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドが膜などに固定されていることを特徴とする、上記いずれかのオリゴヌクレオチドプローブである。また、本発明は上記に記載のオリゴヌクレオチドプローブを、人の血液あるいは/および口腔粘膜あるいは/および髪の毛あるいは/および爪を検体とした検出に用いることを特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピングの方法である。

【0014】また、本発明はHLA-DR抗原の遺伝子タイピングを行なうための検体からDNAを得る際に使用されるものであって、塩化カリウム、塩化マグネシウム、ゼラチン、界面活性剤、プロテナーゼKを含むことを特徴とするトリス塩酸緩衝液である。また、本発明は前記検体から得られるHLA-DR抗原をコードするDNAの内、少なくとも前記オリゴヌクレオチドプローブの塩基配列を含む領域であり、且つ少なくともその一部がラジオアイソトープあるいは/および蛍光、発光、発色のいずれかの現象を起こし得る物質で標識されている、あるいは該物質により標識され得るように修飾されていることを特徴とする検体DNAおよび該DNAを含む溶液である。

10

【0015】また、本発明はHLA-DR抗原をコードする塩基配列の内、上記いずれかのオリゴヌクレオチドの塩基配列を含む部分領域を下記の方法で増幅するHLA-DR抗原をコードする塩基配列の増幅方法である。

(1) 耐熱性DNAポリメラーゼ存在下に、オリゴヌクレオチドプライマーと加熱処理によってデネイチャーしたHLA-DRをコードする染色体DNAをアニールし、  
 (2) アニールしたDNAを加熱処理してプライマイクステンションさせ、(3) (1) および(2) のステップを繰り返す。

【0016】また、本発明は増幅反応をラジオアイソトープおよび/あるいは蛍光、発光、発色のいずれかの現象を起こし得る物質で標識されている、あるいは該物質により標識され得るように修飾されているオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行うことを特徴とする上記増幅方法である。また、本発明は該増幅反応をラジオアイソトープおよび/あるいは蛍光、発光、発色のいずれかの現象を起こし得る物質で標識されている、あるいは該物質により標識され得るように修飾されている核酸を用いて行ない上記いずれかに記載のオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションさせることを特徴とする上記増幅方法である。

【0017】また、本発明は上記に記載のオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列が配列番号65または配列番号66で表わされるオリゴヌクレオチドプライマーである。

FPR1: 配列番号65に記載の核酸塩基配列

DRβAMP1: 配列番号66に記載の核酸塩基配列

また、本発明はHLA-DR抗原の遺伝子タイピングを行なうためにDNA増幅反応を行なう際に使用するものであって、塩化カリウム、塩化マグネシウム、ゼラチン、dGTP、dCTP、dTTP、dATPおよび上記のオリゴヌクレオチドプライマーを含むことを特徴とするトリス・塩酸緩衝液である。

【0018】また、本発明は上記記載のオリゴヌクレオチドプローブに前記DNAをハイブリダイゼーションさせる際に使用するものであって、テトラメチルアンモニウム、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム、デンハルト液、ドデシル硫酸ナトリウム、キャリアーDNAを含むことを特徴とするトリス塩酸緩衝液である。また、本発明は上記記載のオリゴヌクレオチドプローブに検体のDNAをハイブリダイゼーションさせた後の洗浄に使用するものであって、テトラメチルアンモニウム、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム、デンハルト液、ドデシル硫酸ナトリウム、を含むことを特徴とするトリス塩酸緩衝液である。

【0019】また、本発明は上記記載のオリゴヌクレオチドプローブ、上記記載オリゴヌクレオチドプライマー、上記記載の緩衝液の内、該オリゴヌクレオチドプローブを含む少なくとも2種類以上の構成物からなること



を特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用の試薬キットである。また、本発明は上記記載の試薬キットに、遺伝子採取処理用、DNA増幅反応用、ハイブリダイゼーション用、ハイブリダイゼーション後の洗浄用、検出反応用チューブなどの必要な器具のすべてあるいは一部を加えて構成されることを特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピング用の検査キットである。

【0020】また、本発明はHLA-DR抗原の遺伝子タイピングを行なうに際し、上記に記載の塩基配列群で表わされるオリゴヌクレオチドプローブおよび上記記載の試薬キットあるいは検査キットを使用することを特徴とするHLA-DR抗原の遺伝子タイピングの方法である。次に本発明に係るHLA-DR分子をコードする遺伝子配列の内、各タイプに特異的な検出部位に相当するDNA塩基配列およびタイピング方法について具体的に説明する。

【0021】本発明に係るHLA-DRをコードする遺伝子の検出部位に相当するDNA塩基配列は、超可変領域と呼ばれる領域の塩基配列である。HLA関連の遺伝子構成を図1に示すが、この中のDRB領域にある超可変領域を含む塩基配列の中から特異的な配列を選びだし、新規なオリゴヌクレオチドプローブを開発し、さらにそれらを組み合わせることにより各タイプを精密にタイピングする事を可能としたのである。

【0022】プローブに関して

従来の技術では検出することが不可能な遺伝子型、あるいは既にオリゴヌクレオチドプローブは発表されているが、該プローブでは他の遺伝子型との交雑反応が高頻度にかかるため検出時に判断が困難であったものについて、既に報告されているDRB遺伝子の種々のDRBアレルの核酸塩基配列を基礎にして、その塩基配列から特異的な配列を検索し、8種類からなる塩基配列を検出可能とした。

【0023】これらのオリゴヌクレオチドプローブの標的配列は、なるべく少ない数のオリゴヌクレオチドを使用し、なるべく多くのDR型を同定できるように、またオリゴヌクレオチドプローブと非標的DRB型との間で間違っただけを生じさせる主要な原因であるGTミスマッチのチャンスを減らすようにコーディングストランドおよび非コーディングストランド双方を対象として特異的な配列を選択した。このようにして選択したオリゴヌクレオチドプローブの標的配列群を以下に列挙する。

OA3：配列番号1記載の核酸塩基配列  
OF10：配列番号2記載の核酸塩基配列  
OA1416：配列番号3記載の核酸塩基配列  
OK1406：配列番号6記載の核酸塩基配列  
OF30：配列番号4記載の核酸塩基配列  
OF44：配列番号5記載の核酸塩基配列  
OF45：配列番号6記載の核酸塩基配列  
OF863：配列番号7記載の核酸塩基配列

OF851：配列番号8記載の核酸塩基配列  
上記の塩基配列を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブは下記のとおりである。

A3：配列番号9記載の核酸塩基配列  
F10：配列番号10記載の核酸塩基配列  
A1416：配列番号11記載の核酸塩基配列  
K1406：配列番号69記載の核酸塩基配列  
F30：配列番号12記載の核酸塩基配列  
F44：配列番号13記載の核酸塩基配列  
F45：配列番号14記載の核酸塩基配列  
F863：配列番号15記載の核酸塩基配列  
F851：配列番号16記載の核酸塩基配列

これらのオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより、下記の遺伝子型の判定が容易に行えるようになった。

A3：配列番号9に記載の核酸塩基配列：B1\*0301, B1\*0302  
F10：配列番号10に記載の核酸塩基配列：B1\*1001  
A1416：配列番号11に記載の核酸塩基配列：B1\*0302, B1\*1402, B1-JX6, B3\*0301  
K1406：配列番号69に記載の核酸塩基配列：B1\*0302, B1\*1402, B1-JX6, B3\*0301  
F30：配列番号12に記載の核酸塩基配列：B1\*1103  
F44：配列番号13に記載の核酸塩基配列：B1\*0401  
F45：配列番号14に記載の核酸塩基配列：B1\*0403, B1\*0406, B1\*0407  
F863：配列番号15に記載の核酸塩基配列：B1\*0102, B1\*1201, B1-12b, B5\*0201, B5\*0202  
F851：配列番号16に記載の核酸塩基配列：B1\*0101, B1\*0102, B1\*0103, B1\*0301, B1\*0302, B1\*0401, B1\*0402, B1\*0403, B1\*0404, B1\*0406, B1\*0407, B1\*0408, B1\*0802, B1\*1001, B1\*1301, B1\*1302, B1\*1402, B1-JX6, B1-PEV, B3\*0201, B3\*0202

これら新規なオリゴヌクレオチドプローブを含めて、日本人のHLA-DR抗原の遺伝子タイピングの為に32種の異なったオリゴヌクレオチドプローブを合成し、DR型およびDRB型を識別することが可能でなった。

OF1：配列番号17記載の核酸塩基配列  
OF2：配列番号18記載の核酸塩基配列  
OF3：配列番号19記載の核酸塩基配列  
OA3：配列番号1記載の核酸塩基配列  
OF4：配列番号20記載の核酸塩基配列  
OF7：配列番号21記載の核酸塩基配列  
OF8：配列番号22記載の核酸塩基配列  
OF9：配列番号23記載の核酸塩基配列  
OF10：配列番号2記載の核酸塩基配列  
OF11：配列番号24記載の核酸塩基配列

OF13: 配列番号25記載の核酸塩基配列  
 OF52: 配列番号26記載の核酸塩基配列  
 OF52c: 配列番号27記載の核酸塩基配列  
 OA1416: 配列番号3記載の核酸塩基配列  
 OF53: 配列番号28記載の核酸塩基配列  
 OF120: 配列番号29記載の核酸塩基配列  
 OF121: 配列番号30記載の核酸塩基配列  
 OF122: 配列番号31記載の核酸塩基配列  
 OF123: 配列番号32記載の核酸塩基配列  
 OF142: 配列番号33記載の核酸塩基配列  
 OF143: 配列番号34記載の核酸塩基配列  
 OF22: 配列番号35記載の核酸塩基配列  
 OF29: 配列番号36記載の核酸塩基配列  
 OF30: 配列番号4記載の核酸塩基配列  
 OF42: 配列番号37記載の核酸塩基配列  
 OF44: 配列番号5記載の核酸塩基配列  
 OF45: 配列番号6記載の核酸塩基配列  
 OF46: 配列番号38記載の核酸塩基配列  
 OF141: 配列番号39記載の核酸塩基配列  
 OF158: 配列番号40記載の核酸塩基配列  
 OF863: 配列番号7記載の核酸塩基配列  
 OF851: 配列番号8記載の核酸塩基配列  
 ..... [A]  
 F1: 配列番号41記載の核酸塩基配列  
 F2: 配列番号42記載の核酸塩基配列  
 F3: 配列番号43記載の核酸塩基配列  
 A3: 配列番号9記載の核酸塩基配列  
 F4: 配列番号44記載の核酸塩基配列  
 F7: 配列番号45記載の核酸塩基配列  
 F8: 配列番号46記載の核酸塩基配列  
 F9: 配列番号47記載の核酸塩基配列  
 F10: 配列番号10記載の核酸塩基配列  
 F11: 配列番号48記載の核酸塩基配列  
 F13: 配列番号49記載の核酸塩基配列  
 F52: 配列番号50記載の核酸塩基配列  
 F52c: 配列番号51記載の核酸塩基配列  
 A1416: 配列番号11記載の核酸塩基配列  
 F53: 配列番号52記載の核酸塩基配列  
 F120: 配列番号53記載の核酸塩基配列  
 F121: 配列番号54記載の核酸塩基配列  
 F122: 配列番号55記載の核酸塩基配列  
 F123: 配列番号56記載の核酸塩基配列  
 F142: 配列番号57記載の核酸塩基配列  
 F143: 配列番号58記載の核酸塩基配列  
 F22: 配列番号59記載の核酸塩基配列  
 F29: 配列番号60記載の核酸塩基配列  
 F30: 配列番号12記載の核酸塩基配列  
 F42: 配列番号61記載の核酸塩基配列  
 F44: 配列番号13記載の核酸塩基配列  
 F45: 配列番号14記載の核酸塩基配列

F46: 配列番号62記載の核酸塩基配列  
 F141: 配列番号63記載の核酸塩基配列  
 F158: 配列番号64記載の核酸塩基配列  
 F863: 配列番号15記載の核酸塩基配列  
 F851: 配列番号16記載の核酸塩基配列  
 ..... [B]  
 上記配列番号1乃至配列番号8に示した核酸塩基配列および配列番号9乃至配列番号16に示した新規なオリゴヌクレオチドDNAプローブを含む上記式[A]に記載した塩基配列群を検出する核酸プローブ群および上記式[B]に記載したオリゴヌクレオチドであるDNAプローブ群において、交雑反応を起こすために必要な連続した少なくとも10塩基の核酸塩基配列を含むことを特徴とするHLAのDRタイピング用の核酸プローブが使用され得るのである。  
 【0024】これらのプローブ群を使用すると、血清学的に決定されたDR型は、上記32種のオリゴヌクレオチドの内少なくとも一つで陽性として判定される。また、特殊な細胞D特異性に伴うDRB型のほとんどは一種のオリゴヌクレオチドあるいはオリゴヌクレオチドの組合せで同定可能である。また更に、例えばDRB1-12b、DRB1-14c、DRB1-JX6などいくつかのDRB型は現時点で容易に入手できる免疫学的試薬では同定困難であるが、これらも含めて我々のオリゴヌクレオチドタイピングによって同定可能となる。以下に本発明において使用されるオリゴヌクレオチドであるDNAプローブが同定できるDR型を纏めて記載した。  
 【0025】F1: 配列番号41記載の核酸塩基配列: DR1、B1\*0101、B1\*0102、B1\*0103  
 F2: 配列番号42記載の核酸塩基配列: DR2、B5\*0101、B5\*0102、B5\*0201、B5\*0202、(Obata F., Abe A., Ohkubo M. ら、Hum Immunol 27巻 269頁-284頁 1990年)  
 A3: 配列番号9記載の核酸塩基配列 (F3: 配列番号43記載の核酸塩基配列): DR3、B1\*0301、B1\*0302  
 F4: 配列番号44記載の核酸塩基配列: DR4、B1\*0401、B1\*0402、B1\*0403、B1\*0404、B1\*0405、B1\*0406、B1\*0407、B1\*0408、(Obata F., Abe A., Ohkubo M. ら、Hum Immunol 27巻 269頁-284頁 1990年)  
 F7: 配列番号45記載の核酸塩基配列: DR7、B1\*0701、B1\*0702、  
 F8: 配列番号46記載の核酸塩基配列: DRw8、JX6、B1\*0801、B1\*0802、B1\*0803、B1-JX6、(Abe A., Ito I., Ohkubo M. ら、Immunogenetic

15

s 30巻422頁-426頁 1989年)  
 F9: 配列番号47記載の核酸塩基配列: DR9, B1\*0901  
 F10: 配列番号10記載の核酸塩基配列: DRw10, B1\*1001  
 F11: 配列番号48記載の核酸塩基配列: DRw11, B1\*1101, B1\*1102, B1\*1103, B1\*1104  
 F13: 配列番号49記載の核酸塩基配列: DRw13, DR4-Dw10, B1\*0103, B1\*0402, B1\*1102, B1\*1302  
 F52: 配列番号50記載の核酸塩基配列: DRw11, DRw12, DRw13, DRw14, JX6, DR3-Dw3, B3\*0101, B3\*0201, B3\*0202, B3\*0301, (Obata F., Abe A., Ohkubo M. ら, Hum Immunol 27巻 269頁-284頁 1990年)  
 A1416: 配列番号11記載の核酸塩基配列および/あるいはK1406: 配列番号69記載の核酸塩基配列 (F52c: 配列番号51記載の核酸塩基配列): DRw14-Dw16, DR3, JX6, DRw13, B1\*0302, B1\*1402, B1-JX6, B3\*0301, (Obata F., Ito I., Ito K. ら, Immunogenetics 32巻 313頁-320頁 1990年)  
 F53: 配列番号52記載の核酸塩基配列: DR4, DR7, DR9, (Obata F., Abe A., Ohkubo M., Ito I., Kaneko T., Otani F., Watanabe K., Kashiwagi N. ら, Hum Immunol 27巻 269頁-284頁 1990年)  
 F120: 配列番号53記載の核酸塩基配列: DRw12a, DRw12b, B1\*1201, B1-12b, (Abe A., Ito I., Ohkubo M. ら, Immunogenetics 30巻 422頁-426頁 1989年)  
 F121: 配列番号54記載の核酸塩基配列: DRw12a, B1\*0803, B1\*1201, (Abe A., Ito I. ら, Ohkubo M. ら, Immunogenetics 30巻 422頁-426頁 1989年)  
 F122: 配列番号55記載の核酸塩基配列: DRw12b, B1\*0801, B1\*0802, B1\*1101, B1\*1104, B1\*12b, B1-PEV, B1\*1601, B5\*0101, B5\*0102, (Abe A., Ito I., Ohkubo M. ら, Immunogenetics 30巻 422頁-426頁 1989年)

16

F123: 配列番号56記載の核酸塩基配列: JX6, DR2-Dw22, B1\*1602, B1-JX6, (Obata F., Abe A., Ohkubo M. ら, Hum Immunol 27巻 269頁-284頁 1990年)  
 F142: 配列番号57記載の核酸塩基配列: DRw14c, B1-14c, (Obata F., Ito I., Ito K. ら, Immunogenetics 32巻 313頁-320頁 1990年)  
 F143: 配列番号58記載の核酸塩基配列: DRw14-Dw9, B1\*1401, (Obata F., Ito I., Ito K. ら, Immunogenetics 32巻 313頁-320頁 1990年)  
 F22: 配列番号59記載の核酸塩基配列: B5\*0101, (Obata F., Ito I., Kaneko T. ら Tissue Antigens 33巻 550頁-558頁 1989年)  
 F29: 配列番号60記載の核酸塩基配列: B1\*0901, B5\*0102, B5\*0201, B5\*0202, (Obata F., Ito I., Kaneko T. ら, Tissue Antigens 33巻 550頁-558頁 1989年)  
 F30: 配列番号12記載の核酸塩基配列: B1\*1103,  
 F42: 配列番号61記載の核酸塩基配列: B1\*0406, (Obata F., Ito I., Kaneko T. ら, Tissue Antigens 33巻 550頁-558頁 1989年)  
 F44: 配列番号13記載の核酸塩基配列: B1\*0401,  
 F45: 配列番号14記載の核酸塩基配列: B1\*0403, B1\*0406, B1\*0407,  
 F46: 配列番号62記載の核酸塩基配列: B1\*0101, B1\*0102, B1\*0404, B1\*0405, B1\*0408, B1\*1402, (Obata F., Ito I., Ito K. ら, Immunogenetics 32巻 313頁-320頁 1990年)  
 F141: 配列番号63記載の核酸塩基配列: B1\*0701, B1\*0702, B1\*1401, B1-14c, B3\*0301, (Obata F., Ito I., Ito K. ら, Immunogenetics 32巻 313頁-320頁 1990年)  
 F158: 配列番号64記載の核酸塩基配列: B1\*0405, B1\*0801, B1\*0803, B1\*1303, (Obata F., Ito I., Kaneko T. ら, Tissue Antigens 33巻 550頁-558頁 1989年)  
 F863: 配列番号15記載の核酸塩基配列: B1\*0

102、B1\*1201、B1-12b、B5\*0201、B5\*0202、  
F851: 配列番号16記載の核酸塩基配列: B1\*0101、B1\*0102、B1\*0103、B1\*0301、B1\*0302、B1\*0401、B1\*0402、B1\*0403、B1\*0404、B1\*0406、B1\*0407、B1\*0408、B1\*0802、B1\*1001、B1\*1301、B1\*130\*

HLA-DRタイピング用オリゴヌクレオチドプローブ

\*2、B1\*1402、B1-JX6、B1-PEV、B3\*0201、B3\*0202

これらのプローブによって得られるタイピング結果について、表1に遺伝子型および判明しているDRおよびDフェノタイプを記載した。

【0026】

【表1】

プローブ名	塩基配列	位置	遺伝子型
F1	ATAGATGCATCTTTCCAGC	79-98 (-)	B1*0101, B1*0102, B1*0103
F2	GTGGGGTTCTGCACAGAG	79-98 (+)	B5*0101, B5*0102, B5*0201, B5*0202
F3	GTGGACAACACTACTGCAGAC	223-241 (+)	B1*0301, B1*0302
A3	GCGGGGTGGACAAGTACT	219-235 (+)	
F4	TACTTGTATCAGCAAGAGG	89-106 (+)	B1*0401, B1*0402, B1*0403, B1*0404 B1*0405, B1*0406, B1*0407, B1*0408
F7	ATAGAAGAGTCTTTCCAGG	79-98 (-)	B1*0701, B1*0702
F8	TAGGTGTCCAGCAGGGCG	219-233 (-)	B1*0801, B1*0802, B1*0803, B1-JX6
F9	TCTGTGCAGATACGGCACC	69-87 (-)	B1*0901
F10	TTATGGACGGCTCTTTCCA	99-98 (-)	B1*1001
F11	GCCTGATGAGGAGTACTGG	165-183 (+)	B1*1101, B1*1102, B1*1103, B1*1104
F13	ACATCCTGGAAGACGAGCG	197-215 (+)	B1*0103, B1*0402, B1*1102, B1*1302
F52	TGTCTGCAGTAATTGTCCA	224-242 (-)	B3*0101, B3*0201, B3*0202, B3*0301
F52c	GTTCTCTGGAGAGATACTTC	75-93 (+)	B1*0302, B1*1402, B1-JX6, B3*0301
A1416	AGCGCACGTTCTCTCTCTG	109-118 (-)	
K1406	GCACGTTCTCTCTCTGGTT	103-121 (-)	
F53	GAGTGTGGAACCTGATCAG		
F120	AGGAGGAGCTCCTGCGCTT	101-119 (+)	B1*1201, B1-12b
F121	GACATCCTGGAAGACAGGG	196-214 (+)	B1*0803, B1*1201
F122	ACTTCTGGAAGACAGGGCG	197-215 (+)	B1*0901, B1*0902, B1*1101, B1*1104, B1-12b B1-PEV, B1*1601, B5*0101, B5*0102
F123	GACCTCTGGAAGACAGGG	196-214 (+)	B1*1002, B1-JX6
F142	AGTACTCAGCATCAGGCCG	182-191 (-)	B1-14c
F143	TGCTGCGGAGCACTGGAAC	168-185 (-)	B1*1401
F22	AGCGCAAGTCTCTCTGTTG	100-118 (-)	B5*0101
F29	TTATAGATGCCTCTGTGCA	99-98 (-)	B1*0301, B5*0102, B5*0201, B5*0202
F30	GCTGCTCTCCAGGAAGTC	196-214 (-)	B1*1103
F42	TATCACCAAGAGGAGTCCGT	64-113 (+)	B1*0406
F44	GAGCAGAAGCGGGCGCGG	205-222 (+)	B1*0401
F45	AGCAGAGCGGGCGCGAGG	206-223 (+)	B1*0403, B1*0406, B1*0407
F46	GCAGAGGGCGGGCGCGGT	207-224 (+)	B1*0101, B1*0102, B1*0404, B1*0405, B1*0406 B1*1402
F141	AGGGCAGCAACTCCTCCTG	100-118 (-)	B1*0701, B1*0702, B1*1401, B1-14c, B3*0301
F158	GGGCTAGCGCGGAGTACT	164-181 (+)	B1*0405, B1*0801, B1*0903, B1*1303
F863	TACGGGGCTGTGGAGAGC	247-264 (+)	B1*0102, B1*1201, B1*12b, B5*0301, B5*0202
F851	TACTCGGCATCAGGCCCGC	162-179 (-)	B1*0101, B1*0102, B1*0103, B1*0301, B1*0302 B1*0401, B1*0402, B1*0403, B1*0404, B1*0406 B1*0407, B1*0408, B1*0802, B1*1001, B1*1301 B1*1302, B1*1402, B1-JX6, B1-PEV, B3*0201 B3*0202

位置を示す番号はエクソン部の最初の塩基を13番目として記載した。

(+)はオリゴヌクレオチドプローブがコーディングストランドに対して合成され、(-)は非コーディングストランドに対して合成されていることを示す。

【0027】なお、DRB1アレルのペアがDRB1\*0403-DRB1\*0407、DRB1\*0404-DRB1\*0408、DRB1\*1101-DRB1\*1104、およびDRB1\*1301-DRB1\*1302の間で分別するにはオリゴヌクレオチドは使用できない。これらのDRB1ドメインの配列は互いにアミノ酸#86(グリシンあるいはバリン)のみが異なっており、この部位の配列が実に多くのDRBアレルに共有され過ぎているため、特殊なDRBの型を同定する事は本発明に記載のオリゴヌクレオチドによるタイピングでは不可能だからである。

【0028】また、DRB1\*0701とDRB1\*0702は同一のDRB1ドメイン配列を持っており、区別することは不可能である。本特許においてはこれらの

DRB1型のペアを任意の単独なDR型として記載する。即ちDRB1\*0403およびDRB1\*0407はDRB1\*04(03/07)、DRB1\*0404およびDRB1\*0408はDRB1\*04(04/08)、DRB1\*0701およびDRB1\*0702はDRB1\*07(01/02)、DRB1\*1101およびDRB1\*1104はDRB1\*11(01/04)、DRB1\*1301およびDRB1\*1302はDRB1\*13(01/02)と表わす。

【0029】DRw15関連のDRB型の同定にはDRB5アレル、DRB5\*0101とDRB5\*0102をオリゴヌクレオチドの標的に選んだ。この場合にはDRB5ローカスはDRB1ローカスよりもより多型性に富むからである。(Wu S., Saunders

T. L., Bach F. H. ら, Nature 324巻 676頁-679頁 1986年. Lee B. S. M., Rust N. A., McMichael A. J., McDvitt H. O. ら, Proc Natl Acad Sci USA 84巻 4591頁-4595頁 1987年) 一方、DRw16関連のDRB型の場合にはDRB1とDRB5を遺伝子タイピングの情報ローサイとして選択した。

【0030】これらの事情および特殊なDRB1アレルと特殊なDRB5アレルの間の強い連鎖不平衡のため 10 (Bodmer J. G., Marsh S. G. E., Parham P. ら, Tissue Antigens 35巻 1頁-8頁 1990年. Wu S., Saunders T. L., Bach F. H. ら, Nature 324巻 676頁-679頁 1986年. Lee B. S. M., Rust N. A., McMichael A. J., M

cDvitt H. O. ら, Natl Acad Sci USA 84巻 4591頁-4595頁 1987年. Liu C-P, Bach F. H., Wu S. ら, J Immunol 140巻 3631頁-3639頁 1988年. Knowles R. W., Histocompatibility Testing 1987年 New York, Springer-Verlag, 44頁-46頁 1989年)、DRB1とDRB5型あるいはハプロタイプをDRB1型と同等のDRB型の一つと考えて、DRB1\*1501-B5\*0101、DRB1\*1502-B5\*0102、DRB1\*1601-B5\*0201、およびDRB1\*1602-B5\*0202と表現している。(表2)

【0031】

【表2】

完全には型分けできないDRB型の可能な組合せ

	一つの組合せ	他の組合せ	検出数
1-2	B1*0101	B1*0102	00
3	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
4	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
5	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
6	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
7	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
8	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
9	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
10	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
11	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
12	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
13	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
14	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
15	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
16	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
17	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
18	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
19	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
20	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
21	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00
22	B1*0101	B1*1601-B5*0201	00

【0032】4種のDRB1-B5型のペア、あるいはDRw15およびDRw16特異的に結合しているハプロタイプを含む、33種の異なったDRB型が我々のオリゴヌクレオチドタイピングにより同定可能であるので、検体で現われる2種のDRB型の可能な組合せは全部で561通りになる。コンピュータ検索によれば、これらの内、28ケースでオリゴヌクレオチドタイピングによってはDRB型の2つの組合せのどれに相当するかは判別不能である。この内、7ケースではDRB型の判

定は、DRw11、DRw12、DRw13、DRw150  
4、DRw17、およびDRw18からなるDRw52ファミリーのDRB1アレルが常に4種のDRB3アレル(\*0101、\*0201、\*0202、および\*0301)にリンクしており(Bodmer J. G., Marsh S. G. E., Parham P. ら、Tissue Antigens 35巻1頁-8頁1990年、Abe A., Ito I., Ohkubo M. ら、Immunogenetics 30巻422頁-426頁1989年、Obata F., Abe A., Ohkubo M. ら、

Hum Immunol 27巻 269頁-284頁1990年. Petersdorf E. W., Griffith R. L., Erlich H. A. ら, Immunogenetics 32巻96頁-103頁 1990年. Obata F., Ito I., Ito K. ら, Immunogenetics 32巻 313頁-320頁1990年. Knowles R. W., Dupont B. ら, Histocompatibility Testing 1987年. New York, Springer-Verlag, 44頁-6頁 1989年. Tiercy J-M, Gorski J., Jeannet M., Mach B. ら, Proc Natl Acad Sci USA 85巻198頁-202頁 1988年. Fernandez-Vina M., Shumway W., Stastny P. ら, Hum Immunol 28巻 51頁-64頁 1990年), これら全てがDRB3アレルの一定の配列に対して作られている一種のオリゴヌクレオチドであるF52によって検出されるのでタイピング可能となる。

【0033】その結果、表2に示された21ケースが我々のオリゴヌクレオチドタイピングでは同定不能として残される。

#### 検出対象物質

本特許において提案しているオリゴヌクレオチドプローブ群は細胞表面に表現されている膜タンパク質を形成するDNA塩基配列の一部に相当している。従って、染色体DNAを検出対象とすることはもちろん、メッセンジャーRNA、C-DNAに対しても有効である。これらの3種類の核酸類の採取には既知の方法が用いられる。これらの検出対象の内いづれを選択するかは、検査が行われる環境により変化する。

【0034】また、本発明において使用される検体DNAは、ヒトの種々の部分から採取することが可能である。その例としては、末梢血、口腔粘膜、髪の毛など体毛および毛根、爪などを挙げるができる。これらの内末梢血、口腔粘膜、体毛および毛根から染色体DNAを採取する場合には、塩化カリウム、塩化マグネシウム、ゼラチン、界面活性剤、プロテナーゼKを含むことを特徴とするトリス塩酸緩衝液が好んで使用される。また、爪から染色体DNAを採取する場合には、塩化ナトリウム、EDTA、ドデシル硫酸ナトリウム、ジチオスレイトール、およびプロテナーゼKを含むトリス塩酸緩衝液が好んで用いられる。この溶液において界面活性剤の例としてはイオン性のドデシル硫酸ナトリウム、非イオン性のツイーン20あるいはノニデートP40を挙げることができるが、中でもツイーン20が好んで使用される。この溶液を使用することによって37℃~60℃の温度で0.1時間~1時間加熱処理し、その後さらに

90℃以上の温度で1分~10分間加熱処理した後、氷冷してフェノール抽出、クロロホルム洗浄を経て染色体DNAの水溶液を得ることができる。本操作によって得られたDNAは、その染色体DNA量が多い場合にはそのままハイブリダイゼーションに使用することができる。

【0035】また、本発明に用いられる上記の核酸は必要に応じて、特にその量が少ない場合にはPCR (ポリメラーゼチェーンリアクション) にかけて特定領域を増幅した後にハイブリダイゼーションに使用することができる。この場合には検体量が増加するので検出が容易になるとの利点がある。染色体DNAの特定領域をPCRに掛ける場合には上記の操作中、加熱処理後のフェノール抽出、クロロホルム洗浄を行わずに単に遠心分離した後に、その上清液を使用することも行なわれる。

#### 【0036】PCR

PCRの方法をDRB型のタイピングに適用するには、可能な全てのDRB型の全ての遺伝子を一揃いのプライマーを使用して一段階で増幅する一般的な方法と、一種のDRB型あるいは一種のDRB遺伝子のみを増幅するグループ特異的増幅法が考えられる。

【0037】この2方法の内、グループ特異的増幅法はグループ特異的な増幅法であるが故に、先ず標的DRB型を同定しておくことが必要であること、また一段階でグループ特異的増幅を行なうためには、分離した個別のチューブ中で可能性がある全てのプライマーを使用し増幅を行なわねばならないとの問題がある。グループ特異的増幅法を採用するか、あるいは一般的増幅法を採用するかは、どの程度精密な遺伝子タイピングが必要に掛かっている。即ち、グループ特異的増幅法は全ての知られているDRB型を同定するのに有用であり、一方、一般的増幅法は多くの検体について、プローブの選択だけで一気にタイピングを行える得られる点で有用である。従って、本特許の目的であるDRB型のタイピングの為に、これらの方法の内、おもに一般的な方法が使用される。

【0038】なお、本特許が提供するオリゴヌクレオチドプローブ群は、グループ特異的増幅法を使用してタイピングを行なう際にも有用であることは言うまでもない。

#### PCR用オリゴヌクレオチドプライマー

本発明において適宜使用されるPCRに用いられるオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列は以下の通りである。

FPR1: 配列番号65記載の核酸塩基配列: (Obata F., Ito I., Kaneko T., Ohkubo M., Ishimoto A. L., Abe A., Kashiwagi N. ら, Tissue Antigens 33巻 550-558頁 1989年)

GH46: 配列番号67記載の核酸塩基配列: (Scharf S. J., Long C. M., Erlich H. A. ら、Hum Immunol 22巻 61-69頁 1988年)

DRβAMP1: 配列番号66記載の核酸塩基配列: (Todd J. A., Bell J. I., McDevitt H. O. ら、Nature 329巻 599-604頁 1987年)

これらの内、オリゴヌクレオチドプライマー、FPR1-DRβAMP1の組み合わせによればDRB遺伝子の第2エクソン部の第2および第3の超可変領域(238bp)を増幅することができる(Oбата F., Abe A., Ohkubo M., Ito I., Kaneko T., Otani F., Watanabe K., Kashiwagi N. ら、Hum Immunol 27巻 269-284頁 1990年)ので最も好ましい。

#### 【0039】増幅反応の条件

オリゴヌクレオチドプローブを膜、粒、板状の物質に固定した状態で使用し、不均一系での交雑反応を行なうのであれば、この増幅反応を行なう際には、該オリゴヌクレオチドプライマーがラジオアイソトープおよび/または蛍光、発色、発光のいずれかの現象をおこし得る物質で標識されている、あるいは該物質により標識され得るように修飾されていること、および/またはオリゴヌクレオチドプライマーを使用して検体遺伝子のDNA増幅反応を行うに際し、その反応の少なくとも一部にラジオアイソトープおよび/または蛍光、発色、発光のいずれかの現象をおこし得る物質で標識されている、あるいは該物質により標識され得るように修飾されている核酸を使用することが必要である。

【0040】一方、検体DNAを膜、粒、棒状の物質に固定した後に標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いてハイブリダイゼーションさせるのであれば、増幅反応において検体DNAを標識することは不用であり、標識したあるいは標識可能な状態に修飾した反応基質を用いる必要はなくなる。上記の増幅反応を円滑に起こすためには酵素に耐熱性DNAポリメラーゼを用い、塩化カリウム、塩化マグネシウム、ゼラチン、dGTP、dCTP、dTTP、dATPおよびオリゴヌクレオチドプライマーを含むトリス・塩酸緩衝液中で反応させることが好ましい。なおオリゴヌクレオチドプローブを固定した膜等を使用してハイブリダイゼーションさせるのであれば検体となるDNAを標識しておくことが必要であり、ラジオアイソトープを含む核酸、あるいはビオチン化など非放射性物質で修飾したdATP、dUTPなどの核酸、あるいはラジオアイソトープあるいはビオチン化など非放射性物質で修飾したオリゴヌクレオチドプライマーを添加する方法を採用することになる。この中で、ラジオアイソトープを使用するよりもビオチン化

ど非放射性物質で修飾した物質を使用する方法が検査の安全対策上好んで用いられる。ビオチン化した核酸の中ではハイブリダイゼーションを円滑に行なわせるためにビオチン化-14-dATPが好んで用いられる。例えばビオチン化-14-dATPの代わりにビオチン化-21-dUTPを使用するとハイブリダイゼーション強度にばらつきが認められることがある。

【0041】この際、検体となる組織の量、血液の量などにより異なるが、PCR反応は20回以上の降温および昇温のサイクルを繰り返して行われ、検体DNAはほぼ1μg程度に増幅されることが、引き続き検査を円滑に行なうためには好ましい。なお、検体量が少ない場合には30回のPCRを行なった後、その反応液に酵素を添加し、さらにPCRを繰り返して行なうことも有効である。

【0042】具体的には、髪の毛などの体毛から採取したDNA溶液を使用する場合には、1回目の反応をまず94℃で3分間加熱し、引き続き58℃で2分間、更に72℃で2分間行い、2回目以降のPCRは94℃で1分間、58℃で1分間、72℃で2分間、最後が72℃で2分間という条件で行なうことが好ましい。また口腔粘膜細胞ほぼ3万個から採取したDNA溶液を使用する場合には、1回目の反応をまず94℃で3分間加熱し、引き続き58℃で2分間、更に72℃で2分間行い、2回目以降のPCRは94℃で10秒間、58℃で30秒間、72℃で1分間、最後が72℃で2分間という条件で行なうことが好ましい。

【0043】オリゴヌクレオチドプローブの使用形態  
オリゴヌクレオチドプローブは該プローブを適当な基材に化学的に結合させ、該基材に固定するか、あるいは物理的に吸着させ固定するかのいずれかの形態、あるいは溶液中において溶解あるいは懸濁した状態で使用することが可能であり、これらのいずれの形態をとってもよい。しかし、ハイブリダイゼーション時には一般には大過剰量のオリゴヌクレオチドプローブを使用するため、オリゴヌクレオチドプローブを溶液中に溶解した状態あるいは懸濁状態でハイブリダイゼーションする場合には、通常未交雑のオリゴヌクレオチドプローブを除去しハイブリダイゼーションの有無を検知しなければならないので、検体となる遺伝子あるいは遺伝子の断片を核酸固定用の膜などの基材に予め固定しておき、該基材を使用してハイブリダイゼーションさせる方法、あるいは、逆にオリゴヌクレオチドプローブを固定しておき検体DNAあるいはその断片を溶解あるいは懸濁した液を使用してハイブリダイゼーションさせる方法、また後者の方法の変法として該オリゴヌクレオチドプローブに加え、検体中の該オリゴヌクレオチドプローブに相当するDNA塩基配列以外の部分の塩基配列に相当する少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプローブを用い、このプローブを核酸固定用の膜に固定しておき、ハイブリダ



イゼーションを行う方法、オリゴヌクレオチドの3'末端あるいは5'末端に特定の配列を連結しておき、この塩基配列に相補な配列を予め膜などの固定用該基材に固定しておきハイブリダイゼーションを行う方法などが採用される。

【0044】これらの方法の中では、オリゴヌクレオチドプローブを不均一相においてより容易に検体DNAと交雑反応を行えるよう、該プローブを化学的に結合した状態で、あるいは物理的に吸着した状態でのいずれかの状態で固定した形状で使用方法が好んで使用される。この方法において、交雑反応に支障が無い形式で化学的に結合した状態で使用することが好ましいことは言うまでもない。この際にプローブを結合させる物質としては膜状の物質、粒状の物質、板状の物質があり、これらのいずれかから選択されることになる。交雑反応時の操作性を良好にするために、これらの中では膜状あるいは板状の物質が好んで用いられ、なかでも膜状の物質が最も好んで用いられる。

【0045】プローブをこれらの物質に固定するには、固定量を増加させるために、また該基材上での交雑反応の阻害を抑制するために、固定する前に一般的には核酸のホモポリマーでテーリングしておき、このテーリングしたプローブを固定することが好ましい。そのためには、一般的には、酵素にターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを、反応基質としてdTTP、あるいはdATP、あるいはdCTP、あるいはdGTPを使用して行なうプローブの3'末端のテーリング処理が採用される。

【0046】この処理においては、カコジル酸ナトリウム、塩化コバルト、ジチオスレイトール、dTTP、あるいはdATP、あるいはdCTP、あるいはdGTPおよびプローブを含むトリス塩酸緩衝液が用いられる。この際にホモポリマーとしてはdTTPを反応基質に用いるポリdTが好んで形成され、その長さは50塩基長以上2000塩基以下、好ましくは100塩基長以上1000塩基以下、より好ましくは200塩基長以上500塩基以下の塩基長で形成される。

【0047】このようにして得られるテーリングしたオリゴヌクレオチドプローブはセルロースあるいはナイロンを成分として含有する膜に加熱法あるいは紫外線照射法あるいは他の方法で化学結合を形成させて固定する。これらの膜の具体例としては、HybondTM-C、HybondTM-C extra、HybondTM-E CL、HybondTM-N、HybondTM-N+(Amersham社)、Whatman 541 filter (Whatman社)、DuralonTM UV、Duralose-UV TM (Stratagene社)、PhotoGene Nylon Membrane (BRL社)などを挙げることができるが、これら以外を使用しても遺伝子あるいはオリゴヌクレオチドプローブを結合させ得るものであれば差し支え

ない。これらの膜に遺伝子あるいはオリゴヌクレオチドプローブを固定するには加熱処理、あるいはUV照射処理などの方法によるが、このいずれかあるいは別の方法によるかについては、使用する膜の性質によって適宜変更することになる。例えば、Duralon UV、Hybond-N+を使用する場合にはUV照射法により固定し、Hybond-C extraを使用する場合には真空中80℃に加熱する方法が好んで採用される。

【0048】一方、検体遺伝子を固定するためには、検体DNAをそのまま加熱処理あるいは紫外線照射する方法などが採用される。また検出に必要な塩基配列以外の部位に、例えば5'末端あるいは3'末端をポリdT等で修飾することが好ましい場合があり、これらの場合には検体遺伝子を修飾することも行われる。これらのための方法として、3'末端の修飾には核酸とターミナルデオキシヌクレオチディルトランスフェラーゼによる伸長反応あるいは修飾に必要な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドトリガーを用いる伸長反応がある。また、5'末端の修飾にはPCRに用いるプライマーの5'末端部分に予め適当な塩基配列を結合させておく方法などが採用される。

【0049】交雑の有無を調べるには、ハイブリダイゼーションの方法によって異なるが、オリゴヌクレオチドプローブあるいは検体DNAをラジオアイソトープおよび/または蛍光、発色、発光のいずれかの現象をおこし得る物質で標識しておく、あるいは該物質により標識され得るように修飾しておくことにより、該標識物質を検出することで行なわれる。

【0050】ここで用いられる標識物質としては、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>125</sup>Iのようなラジオアイソトープ、あるいはフルオレセインイソチオシネート(FITC)のような蛍光色素あるいはビオチン、ジゴキシゲニンなどのような非ラジオアイソトープを挙げることができる。検出に当たっては、ラジオアイソトープはX線フィルムに感光させるなど公知の方法が、蛍光物質の場合には蛍光光度計による測定が、ビオチン、ジゴキシゲニンの場合には各々ストレプトアビジンあるいは抗ジゴキシゲニン抗体に結合した酵素などにより発光現象あるいは呈色現象などを起こし、これらを光度計により測定する方法、X線フィルムに感光させる方法が採用される。ここで使用される酵素としては例えばアルカリフォスファターゼ、ワサビ過酸化酵素を挙げることができる。

【0051】これらの標識物質は、オリゴヌクレオチドの合成時に、あるいは検体遺伝子の調製時あるいは増幅時に、これらの目的に合った修飾を施した核酸を使用することによりこれらの塩基配列中に挿入することも、また、5'末端部あるいは3'末端部に付加することも可能である。このようにして得られた標識化オリゴヌクレオチドあるいは標識化検体遺伝子はいずれもHLA-D

Rのタイピングに使用することができる。

#### 【0052】ハイブリダイゼーション

本発明では、ハイブリダイゼーションを必要とする種類のプローブを固定した膜状物質あるいは粒状物質あるいは板状物質、および検体から増幅したDNA断片をアルカリ変性した検体DNAを使用して行うことを推奨する。この交雑反応には、3M 塩化テトラメチルアンモニウム、2mM EDTA、5×デンハルト溶液、0.1重量% SDS (ドデシルスルホン酸ナトリウム)、更に100μg/mlの濃度の変性DNAを含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)が好んで用いられる。しかし、この他の組成の液も使用されることは言うまでもなく、その例としては、6×SSC (0.9M 塩化ナトリウム、0.09M クエン酸ナトリウム)、0.5% SDS、100μg/mlの濃度の変性DNAを含む液などが挙げられる。

【0053】上記の溶液中で42℃の温度で30分乃至10時間ハイブリダイゼーションを行なう。ハイブリダイゼーション後は通常、プローブを固定し、ハイブリダイゼーションにかけた膜を室温下、組成が6×SSCおよび0.1% SDSである洗浄溶液の中で5分間づつ2回乃至5回洗浄し、引続きハイブリダイゼーション時の温度である40℃乃至65℃の温度で5分乃至30分間洗浄する。その後、2×SSC溶液中で1回室温下洗浄する。ここで洗浄液に組成が6×SSCおよび0.1% SDSの溶液の代わりに2×SSPE (0.3M 塩化ナトリウム、0.02M 磷酸1ナトリウム、2mM EDTA) および0.1% SDSの溶液、あるいは塩化テトラメチルアンモニウム溶液を使用することもできる。

【0054】上記したように、本発明ではハイブリダイゼーションを必要とする種類のオリゴヌクレオチドプローブを固定した膜状物質あるいは粒状物質あるいは板状物質、および検体から増幅したDNA断片をアルカリ変性した検体DNAを使用して行うことを推奨するが、検体から増幅したDNA断片を前記の方法で固定した膜状物質あるいは粒状物質あるいは板状物質および溶液中に溶解したオリゴヌクレオチドプローブを用いて行なうことも可能である。

【0055】この時のハイブリダイゼーションは、例えば以下のように行なわれる。まず、膜を一片に1個のドットがあるようにして12片に切り取り、各片をまず12種の32Pラベルしたオリゴヌクレオチドプローブ(F1、F2、F4、F7、F8、F9、F11、F120、F13、F123、F142、F143、各2ng/ml)で6×SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム)、0.5% SDS、5×デンハルト液の混合液中、37℃で2~3時間ハイブリダイズさせ、膜は下記の条件で洗浄する。ここでまずこれらのオリゴヌクレオチドプローブに対する結果を調べる。

【0056】この結果が得られた後に、膜を0.4MN aOH中、15分間37℃で処理し、続いて0.1×SSC (15mM塩化ナトリウム、1.9mMクエン酸ナトリウム、pH7.0) 0.01% SDSからなる水溶液中、更に15分間37℃で処理してオリゴヌクレオチドプローブを除き、他の異なった14種のオリゴヌクレオチドプローブ(F3、F10、F22、F29、F42、F44、F45、F46、F121、F122、F158、F52c、A1416、K1406)と上記の方法でハイブリダイズさせる。また、上記のハイブリダイズでは完全に決められないものには、上記のオリゴヌクレオチドプローブに加えてF30、F52、F141、F851、F863を使用する。

【0057】ハイブリダイズ後の洗浄溶液組成および洗浄温度は以下の通りである。

F1、F2、F7、F9、F29、F143、F158: 6×SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム)、0.1% SDS、54℃  
F4、F8、F10、F22、F52、F52c、A1416、K1406、F121、F851、F863: 6×SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム)、0.1% SDS、57℃  
F11、F13、F30、F42、F120、F122、F123、F141、F142: 6×SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、) 0.1% SDS、62℃

F45、F46: 3M塩化テトラメチルアンモニウム、57℃

F3、F44: 3M塩化テトラメチルアンモニウム、62℃

上記洗浄の全ての場合に、膜の断片を上記の温度で洗浄する前に、洗浄液をもちいて室温下で5分間洗浄する。

【0058】この場合のハイブリダイゼーションはハイブリダイズさせようとするオリゴヌクレオチドプローブごとに個別の容器で実施することが必要となり、使用するオリゴヌクレオチドプローブの数だけの反応容器、および検体DNAを固定した膜状物質あるいは粒状物質あるいは板状物質を用いねばならないこと、従って検査実施者の操作が煩雑になることは言うまでもない。

【0059】このような操作により得られるハイブリダイゼーションの結果の例を図2、図3および図4に示した。

#### 検査結果

上記のオリゴヌクレオチドプローブおよびオリゴヌクレオチドプライマーを使用して血清学的なDR型あるいは細胞学的なD型が不明な健康な日本人375人のDRB遺伝子タイピングを行なった。

【0060】既に記した通り、本特許に記載のオリゴヌクレオチドプローブ群によっても、理論的には21種の同定不可能なケースがある。しかし、これらの21種の同定不可能なケースの内、15ケースは日本人では減多に

見られないDRB型であり、例えば、DRB1\*0102、DRB1\*0103、DRB1\*0301、DRB1\*0302、DRB-PEVおよびDRB1\*1601、DRB5\*0201は今回調べた375人の日本人では認められなかった。従って、最終的に6ケース11人(ケース5、6、9、16、17、18)が同定不能であったにすぎない。即ち375人中364人(97%)の型判定が行えたことになる。

【0061】表3には、上記の結果から得られた遺伝子頻度を、表4には血清学的なタイピングから得られた遺

日本人でのDB型の遺伝子頻度

\*伝子頻度との比較を、また表5には細胞学的なタイピングから得られた遺伝子頻度との比較を示した。この値から、本特許により提供されるプローブ群およびこのプローブ群を使用するタイピング法では、従来のタイピング法によるよりも帰属不可能な型を示すブランクの値が小さくなり、型分け精度が向上していることが明らかである。

【0062】

【表3】

DRB型	HLA特異性 DR	D	検出された 人数	遺伝子頻度
B1*0101	DR1	Dw1	46(+2)	0.66
B1*0102	DR1	Dw20	0	0
B1*0103	DR' BR'	Dw' BON'	0	0
B1*1501-B5*0101	DRw15	Dw2	50	0.069
B1*1502-B5*0102	DRw15	Dw12	66(+2)	0.095
B1*1601-B5*0201	DRw16	Dw21	0	0
B1*1602-B1*0202	DRw16	Dw22	5	0.007
B1*0301	DRw17	Dw3	2	0.003
B1*0302	DRw18	Dw' RSH'	0	0
B1*0401	DR4	Dw4	8	0.011
B1*0402	DR4	Dw10	0	0
B1*04(03/07)	DR4	Dw13	27(1.5)	0.039
B1*04(04/08)	DR4	Dw14	2	0.003
B1*0405	DR4	Dw15	89(+3)	0.131
B1*0406	DR4	D' KT2'	27(+3)	0.041
B1*11(01/04)	DRw11	Dw5/Dw' FS'	22(+1)	0.031
B1*1102	DRw11	Dw' JVM'	0	0
B1*1103	DRw11	Dw' new'	0	0
B1*1201	DRw12	Dw' DB6'	29	0.039
B1-12b	DRw12		9	0.012
B1*13(01/02)	DRw13	Dw18/Dw19	64	0.089
B1*1303	DR' 6V'	Dw' HAG'	0	0
B1-PEV	DR' 6V'	Dw' PEV'	0	0
B1-JX6	-	-	17	0.023
B1*1401	DRw14	Dw9	29	0.039
B1*1402	DRw14	DW16	12	0.016
B1-14c	DRw14	-	12	0.016
B1*07(01/02)	DR7	Dw17/Dw' DB1'	3	0.004
B1*0801	DRw8	Dw8.1	0	0
B1*0802	DRw8	Dw8.2	28(+3)	0.042
B1*0803	DRw8	Dw8.3	54	0.075
B1*0901	DR9	Dw23	99	0.142
B1*1001	DRw10	-	5	0.007
ブランク				- 0.0005

( ) : 遺伝子型分けにおいてDRBアレルで二通りの形式があるもの  
ブランク: 1-遺伝子頻度の合計値

【0063】

【表4】

## 血清学的ワークショップでの遺伝子頻度とプローブでの遺伝子頻度の比較

DR特異性	プローブ型分け n=375	9回IHW n=514	3回AOHW n=472
DR1	0.066	0.062	0.064
DR2 (w15+w16)	0.172	0.155	0.189
DR3 (w17+w18)	0.003	0.006	0
DR4	0.217	0.243	0.236
DRw11	0.031	0.023	0.031
DRw12	0.052	0.061	0.039
DRw13	0.089	0.039	0.032
DRw14	0.072	0.079	0.028
DR7	0.004	0	0.004
DRw8	0.115	0.091	0.133
DR9	0.142	0.127	0.141
DRw10	0.007	0.002	0.004
DRJX6	0.023	-	-
ブランク	0.007	0.113	0.100

【0064】

\* \* 【表5】

## MLRワークショップでの遺伝子頻度とプローブ法での遺伝子頻度の比較

特異性 DR D	プローブ型分け n=375	MLR型分け 3回AOHW n=149-159
DR1 Dw1	0.066	0.075
DR2 Dw2	0.069	0.079
Dw12	0.095	0.096
DR3 Dw3	0.003	0.014
DR4 Dw4	0.011	0.016
Dw10	0	0.013
Dw13	0.039	0.006
Dw14	0.003	0.013
Dw15	0.131	0.092
Dw' KT2'	0.041	0.026
DRw11 Dw5/Dw' FS'	0.031	0.023
DRw13 Dw18/Dw19	0.089	0.055
DRw14 Dw9	0.039	0
Dw16	0.016	0.014
DR7 Dw11	0.004	0
DRw8 Dw8.1	0	0.003
Dw8.3	0.075	0.076
DR9 Dw23	0.142	0.056
ブランク		0.328

## 【0065】検査試薬キットの内容

上記したように、HLA-DRのオリゴヌクレオチドプローブを用いるタイピングにおいて良好な結果を得るためには、該プローブあるいは該プローブを固定した膜状物質、あるいは粒状物質あるいは板状物質が必須であり、さらに該プローブを使用して行なう交雑反応、さらに洗浄を行うために必要な試薬、更に検体からDNAを採取する試薬を含むことが望ましい。また該タイピングを円滑に実施するためにはPCRに使用されるオリゴヌクレオチドプライマーが含まれることが望ましい。

【0066】従って、該タイピングに供される試薬キットには検査に必要となる試薬類および器具類が含まれることが望ましく、具体的にはオリゴヌクレオチドプローブ群あるいはこれらをテーリング処理したオリゴヌクレ

オチドプローブ群あるいはテーリング処理したオリゴヌクレオチドプローブ群を固定処理した膜、粒、板、標識用の試薬、検体DNAの遺伝子増幅反応用の試薬、ハイブリダイゼーション用の試薬、ハイブリダイゼーション後に行う洗浄用の試薬、ハイブリダイゼーション操作および洗浄操作の器具、交雑の有無を判定するためのポジティブコントロールおよびネガティブコントロールの標準試薬、判定結果の表現例、検査の各操作に必要な器具類などが含まれ、これらの全てあるいはオリゴヌクレオチドプローブを必須として他の物品の一部から構成される。

【0067】標識用の試薬としては、PhotoGene™ Nucleic Acid Detection System (BRL, Life Technologies Inc.)、Southern Light Kit (Boehringer Mannheim)

あるいはDIG system™ (Boehringer Mannheim) を例に挙げることができる。また器具としては、BIO-BIK サンプリングチューブ (BioPlastic Co., Ltd.) などのプラスチック製チューブ、ボロシリケート処理したガラス製試験管 (Corning GlassWorks) などの試験管、Pipetman™ (Gilson) などの容量可変デジタル式ピペットおよびそれ用のチップ、加熱シール可能なプラスチックバッグ (コスモバイオ製など)、検査時に生じる発光、蛍光、色を検出する光度計、X線フィルム、露光用カセット、フィルムハンガー (富士メディカルシステム) および恒温槽、水浴槽を挙げることができる。

【0068】 各種の試薬類は必要に応じて濃度を制御できるように使用濃度よりも濃厚な溶液として提供されるのが一般的であるが、検査時の必要濃度に調製していても差し支えない。

【0069】

【発明の効果】 本発明により提供されるオリゴヌクレオチドプローブ群は、HLA-DR抗原をコードする遺伝子の遺伝子型を明確に型分けすることが可能であり、該オリゴヌクレオチドプローブを使用することにより、従来は型分け不可能であった遺伝子型を型分け可能とした。また公知のオリゴヌクレオチドプローブを併せて使用することにより、日本人の場合には、その97%と高率でHLA-DR抗原の遺伝子型を型分け可能とした。このように本発明により提供されるオリゴヌクレオチドプローブならびにそれを使用する遺伝子型分けの方法によれば、従来の型分けによるよりも高精度な型分けが可能となる。特に抗血清によるタイピングが不能なDRの型を含めて判定する為には本発明のオリゴヌクレオチドプローブの使用が必須の要件である。

【0070】 上記のように、本発明により提供されるオリゴヌクレオチドプローブならびにそれを使用する遺伝子型分けの方法により、更に新たな診断手法の開発あるいはその他の医学上の研究の進展も期待できるものである。

【0071】

【実施例】 以下、本発明を実施例により具体的に説明する。ただし、これら実施例は本発明の技術的範囲を限定するものではない。

【0072】

【実施例1】

オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドは、Applied Biosystem 社 (Foster City) 製の自動DNA合成機を使用して合成し、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。

【0073】 PCRプライマーの塩基配列は既に報告されている下記の種類である。

FPR1、DRβAMP1

また、オリゴヌクレオチドプローブの内、以下の分は既に報告されている配列を用いている。

F22、F29、F42、F158

F8、F120、F121、F122

F2、F4、F123、F52

F46、F52c、F141、F142、F143

他のオリゴヌクレオチドプローブは既に報告されているDRBアレルの塩基配列に従って合成した。

【0074】

【実施例2】

検体からの染色体DNAの採取-1

15μlのヒト抹消血あるいは口腔粘膜(約28000個の細胞を含む)を500μlのTE緩衝液(10mM トリス塩酸(pH7.4)、1mMEDTA)に懸濁し、10秒間、エッペンドルフ社製卓上遠心分離機を用いて13000rpmで遠心分離した。遠心分離後、上清液を取り去り、固体物質を残した。ここに500μlのTE緩衝液を加えてよく攪拌し、固体物質を懸濁させ、再度遠心分離した。遠心分離後、上清液を取り去り、固体物質を残した。この操作を引続き2回行い、得た固体物質に、50mM塩化カリウム、10mMトリス塩酸(pH8.3)、1.5mM塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、0.05%ツイーン20、10μgプロテナーゼKからなる溶液100μlを加えて懸濁させ、56℃で45分反応させ、さらに5分間沸騰条件下で加熱処理した後、氷浴中で急冷した。その後、先と同様に遠心分離して染色体DNAを含む上清液を得た。この上清液から5μlを採り、染色体DNA溶液としてPCRに供した。

【0075】

【実施例3】

30 検体からの染色体DNAの採取-2

10mMトリス塩酸(pH7.4)、100mM塩化ナトリウム、1mMEDTAからなる溶液100μlにジチオスレイトール1.5mg、10%SDS25μlを加えて、ヒトの爪を懸濁させ、更に100mgのプロテナーゼKを含む溶液10μlを添加して、56℃で5分~45分反応させ、さらに95℃で10分間加熱処理した後、氷浴中で急冷した。その後、実施例1におけると同様に遠心分離して染色体DNAを含む上清液を得た。この上清液から5μlを採り、染色体DNA溶液としてPCRに供した。

40

【0076】 【比較例1】 50μlの血液を5%EDTA溶液50μlに懸濁し、5秒間実施例1におけると同様に遠心分離した後、上清液を取り除いた。残った固体物質に水200μlを添加して溶解し、5分間沸騰条件下で加熱処理した。得られた溶液を上記と同様に遠心分離して、上清液を採取した。この上清液から40μlを採り、染色体DNA溶液としてPCRに供した。

【0077】 【比較例2】 50μlのヒト血液を5%EDTA溶液50μlに懸濁し、この懸濁液を注射筒と注射針(22ゲージ)を用いて、注射筒への出し入れを5

37

分間行なった。この後、5分間沸騰条件下で加熱処理した。得られた溶液を実施例1と同様に遠心分離して、上清液を採取した。この上清液から40 $\mu$ lを採り、染色体DNA溶液としてPCRに供した。

【0078】〔比較例3〕100 $\mu$ lの血液を、水100 $\mu$ l及び5%EDTA50 $\mu$ lからなる溶液に懸濁し、実施例1におけると同様に遠心分離した後、残った固体物質を0.05%のノニデートP40の水溶液200 $\mu$ lに懸濁し、5分間沸騰条件下で加熱処理した。得られた溶液を上記と同様に遠心分離して、上清液を採取した。この上清液から40 $\mu$ lを採り、染色体DNA溶液としてPCRに供した。

【0079】

【実施例4】ビオチン化-21-dUTPを使用するポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)によるビオチン化 10 $\times$ PCR緩衝液(200mMトリス塩酸、15mMMgCl<sub>2</sub>、250mMKCl、0.5%Tween20、100 $\mu$ g/mlBSA)を5 $\mu$ l、2.5mMdATP、2.5mMdCTP、2.5mMdGTPを各々1 $\mu$ l、1.5mMdTTPを1 $\mu$ l、0.5mMビオチン化-21-dUTPを1.25 $\mu$ l、10 $\mu$ Mプライマー液(FPR1プライマーとDR $\beta$ AMP1プライマーの等量混合溶液)を1 $\mu$ l、実施例2において得たDNA溶液を5 $\mu$ l、さらに水を混合し全容量を49 $\mu$ lとした。この液を混合し、95 $^{\circ}$ Cにて5分間加熱し、室温に放置冷却した。この液に2.5ユニット/ $\mu$ lのTaq. DNA ポリメラーゼ溶液1 $\mu$ lを加え攪拌した後、40 $\mu$ lのミネラルオイルを重層した。この液をASTEC製PC-500を使用し、PCRを30回行った。

【0080】PCRにおける最初の反応は55 $^{\circ}$ Cで2分間、72 $^{\circ}$ Cで3分間の条件で、2回目以降29回までは94 $^{\circ}$ Cで50秒、55 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで2分間の条件で、30回目は72 $^{\circ}$ C3分間の条件で行った。反応液を50 $\mu$ lとり、そこへグリコーゲン(10mg/ $\mu$ l)1 $\mu$ l、3M酢酸ナトリウム(pH5.5)を5 $\mu$ l、エタノールを165 $\mu$ l混合し、攪拌した後-20 $^{\circ}$ Cで30分間冷却した。冷却後5分間12000rpmの条件で遠心し、固形沈澱物を得た。得た沈澱物に70%エタノールを加え、固形沈澱物を洗浄しその後、減圧下にて乾燥した。このようにして得られたUがビオチン化されたDNAからなる固形物を108 $\mu$ lの水に溶解し、DNA濃度が0.01 $\mu$ g/ $\mu$ lの溶液を調製した。PCRによる生成DNAの長さはDNA溶液8 $\mu$ lを1.0%アガロースゲルにかけて確認した。

【0081】〔比較例4〕実施例4において実施例2において得られたDNA溶液の代わりに比較例1において得られたDNA溶液を使用した以外は実施例4と同様に操作した。その結果、アガロースゲルでは明確なバンドが認められず、比較例1において得られたDNA溶液は

38

使用できないことが明らかとなった。

【0082】〔比較例5〕実施例4において実施例2において得られたDNA溶液の代わりに比較例2において得られたDNA溶液を使用した以外は実施例4と同様に操作した。その結果、アガロースゲルでは明確なバンドが認められず、比較例1において得られたDNA溶液は使用できないことが明らかとなった。

【0083】〔比較例6〕実施例4において実施例2において得られたDNA溶液の代わりに比較例3において得られたDNA溶液を使用した以外は実施例4と同様に操作した。その結果、アガロースゲルでは明確なバンドが認められず、比較例1において得られたDNA溶液は使用できないことが明らかとなった。

【0084】

【実施例5】

ビオチン化-14-dATPを使用するPCRによるビオチン化

容量が50 $\mu$ l、実施例2において得られたDNA溶液を5 $\mu$ lを含み、さらに塩化カリウム、トリス塩酸緩衝液(pH8.3)、塩化マグネシウム、ゼラチン、dGTP、dCTP、dTTP、dATP、ビオチン-14-dATP、プライマー、ベントDNAポリメラーゼ(NEB社製)の濃度を各々50mM、10mM、1.5mM、0.001%、50 $\mu$ M、50 $\mu$ M、50 $\mu$ M、30 $\mu$ M、12 $\mu$ M、20 $\mu$ M、0.02u/ $\mu$ lとした水溶液を調製した。この溶液を、95 $^{\circ}$ Cにて5分間加熱し、室温に放置冷却した。この液に2.5ユニット/ $\mu$ lのTaq. DNA ポリメラーゼ溶液1 $\mu$ lを加え攪拌した後、40 $\mu$ lのミネラルオイルを重層した。この液をASTEC製PC-500を使用し、PCRを30回行った。

【0085】PCRにおける最初の反応は55 $^{\circ}$ Cで2分間、72 $^{\circ}$ Cで3分間の条件で、2回目以降29回までは94 $^{\circ}$ Cで50秒、55 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで2分間の条件で、30回目は72 $^{\circ}$ C3分間の条件で行った。反応液を50 $\mu$ lとり、そこへグリコーゲン(10mg/ $\mu$ l)1 $\mu$ l、3M酢酸ナトリウム(pH5.5)を5 $\mu$ l、エタノールを165 $\mu$ l混合し、攪拌した後-20 $^{\circ}$ Cで30分間冷却した。冷却後5分間12000rpmの条件で遠心し、固形沈澱物を得た。得た沈澱物に70%エタノールを加え、固形沈澱物を洗浄しその後、減圧下にて乾燥した。このようにして得られたUがビオチン化されたDNAからなる固形物を108 $\mu$ lの水に溶解し、DNA濃度が0.01 $\mu$ g/ $\mu$ lの溶液を調製した。PCRによる生成DNAの長さはDNA溶液8 $\mu$ lを1.0%アガロースゲルにかけて確認した。

【0086】

【実施例6】

オリゴヌクレオチドプローブのテーリングと膜への固定 10 $\times$ テーリング緩衝液(1Mカコジル酸ナトリウム

39

(pH 7.6)、250mM Tris-HCl (pH 7.6)、2mM ジチオスレイトール)を10 $\mu$ l、100mM dTTPを4 $\mu$ l、プローブを200pmol混合し、そこへ10mM CoCl<sub>2</sub>を10 $\mu$ l添加し、混合した。さらにそこへ25ユニット/ $\mu$ lのターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TOYOBO製)を2 $\mu$ l添加し、全容量を100 $\mu$ lとした。この液を37℃にて2時間反応させた後、フェノールとクロロホルムの1/1混合液100 $\mu$ lにより2回抽出した。抽出液に3M酢酸ナトリウム溶液を10 $\mu$ l、エタノールを330 $\mu$ lを添加し攪拌混合し、-20℃にて30分放置した。その後、遠心し、得られた固形沈殿物を70%エタノールで洗浄した。得られた固形沈殿物を減圧下で乾燥した。

【0087】このようにして得られた固形物を水50 $\mu$ lに溶解し、内42 $\mu$ lの溶液を65℃にて5分加熱し、直ちに水中で冷却した。この溶液に1158 $\mu$ lの10 $\times$ SSC溶液(1.5M塩化ナトリウム、0.19Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)を加え、攪拌した。この溶液を100 $\mu$ lづつミリボア製MilliBlot-Dを使用してナイロン膜Dularon UV (Stratagene社製)にブロットした。さらにMilliBlot-Dのウエルを10 $\times$ SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム溶液で洗浄し、ストラリンカーを使用し、紫外線を120000マイクロジュール照射した。

【0088】得られた膜を5 $\times$ SSPE (0.9M塩化ナトリウム、50mM 磷酸二水素ナトリウム (pH 7.4)、5mM EDTA (pH 7.4))溶液、0.5% SDSからなる水溶液中、37℃で15分間洗浄した。その後、純水中で5分間洗浄した。このようにして得た膜を室温下で風乾した。

【0089】

【実施例7】

ビオチン化-21-dUTPを使用しないPCRによる遺伝子増幅

実施例3において0.5mMビオチン化-21-dUTPを使用せず、さらに添加するdTTPの濃度を2.5mMとした以外は、実施例3と同様に操作してAがビオチン化されたDNAを得た。

【0090】

【実施例8】

DNAプローブのハイブリダイゼーション

健康な日本人ドナーから採取した染色体DNA 1 $\mu$ gをFPR1およびDR $\beta$ AMP1をプライマーに用いて30サイクルのPCRにかけ増幅した。増幅したDR $\beta$ 遺伝子の第2エクソン部の第2および第3超可変領域を含む238塩基対のフラグメントをアルカリ変性し、ナイロン膜に12ドット固定した。

【0091】膜を一片に1個のドットがあるようにして

40

12片に切取り、各片をまず12種の32Pラベルしたオリゴヌクレオチドプローブ (F1、F2、F4、F7、F8、F9、F11、F120、F13、F123、F142、F143、各2ng/ml) で6 $\times$ SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム)、0.5% SDS、5 $\times$ デンハルト液中、37℃で2~3時間ハイブリダイズさせ、膜は下記の条件で洗浄し、オートラジオグラフィーにかけた。

【0092】この結果が得られた後に、膜を0.4MN aOH中、15分間37℃で処理し、続いて0.1 $\times$ SSC (15mM塩化ナトリウム、1.9mMクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.01% SDSからなる水溶液中、更に15分間37℃で処理してオリゴヌクレオチドプローブを除き、他の異なった12種のオリゴヌクレオチドプローブ (F3、F10、F22、F29、F42、F44、F45、F46、F121、F122、F158、F52c)と上記の方法でハイブリダイズさせた。また、上記のハイブリダイズでは完全に決められないものには、上記のオリゴヌクレオチドプローブに加えてF30、F52、F141、F851、F863を使用した。

【0093】ハイブリダイズ後の洗浄溶液組成および洗浄温度は以下の通りである。

F1、F2、F7、F9、F29、F143、F158: 6 $\times$ SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム)、0.1% SDS、54℃  
F4、F8、F10、F22、F52、F52c、F121、F851、F863: 6 $\times$ SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム)、0.1% SDS、57℃:

F11、F13、F30、F42、F120、F122、F123、F141、F142: 6 $\times$ SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、) 0.1% SDS、62℃:

F45、F46: 3M塩化テトラメチルアンモニウム、57℃:

F3、F44: 3M塩化テトラメチルアンモニウム、62℃

上記洗浄の全ての場合に、膜の断片を上記の温度で洗浄する前に、洗浄液をもちいて室温下で5分間洗浄した。

40 結果を図2に示す。

【0094】

【実施例9】

プローブ固定膜を使用するハイブリダイゼーション

プローブを固定した膜をハイブリダイゼーション用プラスチックバッグに入れ、そこへ2mlのハイブリダイゼーション用液 (50mM トリス塩酸 (pH 8.0)、3M テトラメチルアンモニウムクロライド、2mM EDTA (pH 8.0)、5 $\times$ デンハルト液、0.1% SDS、100 $\mu$ g 変性鮭精子DNA) 2mlを加え、42℃で50分間加熱した。その後、増幅し、さらに並行してビ

オチン化-21-dUTPあるいはビオチン化-14-dATPにより標識したDNAを100ng (100μl) 添加し、42℃で振盪しながら3時間加熱を続けた。

【0095】ハイブリダイゼーション後に緩衝液を捨て、バッグから膜を取り出し、洗浄液I (2×SSPE, 0.1% SDS) 中室温下、5分間の間隔で2回洗浄した。次に膜を洗浄液II (50mM トリス塩酸 (pH 8.0)、3M テトラメチルアンモニウムクロライド、2mMEDTA、5×デンハルト液、0.1% SDS) 10 中室温下、5分間洗浄し、さらに洗浄液II中58℃で20分間洗浄し、引続き2×SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム) 溶液中室温下で5分間洗浄した。

【0096】

【実施例10】

プローブ固定膜を使用するハイブリダイゼーション  
プローブを固定した膜をハイブリダイゼーション用プラスチックバッグに入れ、そこへ2mlのハイブリダイゼーション緩衝液 (成分および濃度は以下の通り、50mM トリス塩酸 (pH 8.0)、3M 塩化テトラメチルアンモニウム、2mMEDTA (pH 8.0)、5×デンハルト (0.1% フィコール、0.21% ポリビニルピロリドン、0.1% BSA)、0.1% SDS、100 μg/ml 変性鮭精子DNA) 2mlを加え、42℃で50分間加熱した。その後、そこへ増幅したDNAを100ng (100μl) 添加し、42℃で振盪しながら3時間加熱を続け、ハイブリダイゼーションさせた。

【0097】ハイブリダイゼーション後にハイブリダイゼーション液を捨て、バッグから膜を取り出し、洗浄液I (2×SSPE (0.36M 塩化ナトリウム、20mM 30 磷酸水素ナトリウム、(pH 7.4))、EDTA (pH 7.4))、0.1% SDS) 中室温下、5分間の間隔で2回洗浄した。次に膜を洗浄液II (50mM トリス塩酸 (pH 8.0)、3M テトラメチルアンモニウムクロライド、2mMEDTA、5×デンハルト溶液、0.1% SDS) 中室温下、5分間洗浄し、さらに洗浄液II中58℃で20分間洗浄し、引続き2×SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム) 溶液中室温下で5分間洗浄した。

【0098】

【実施例11】

検出

(BRL社製 PhotoGene™ Nucleic Acid Detection Systemを使用) ハイブリダイゼーションおよび洗浄後の膜をTBS-Tween 20 (100mM トリス塩酸、150mM NaCl、0.05% Tween 20) 中で室温下で1分間洗浄した。続いて、膜1cm2 当り0.75mlのブロッキング溶液 (3% BSA、TBS-Tween 20) 中で室温下50分間処理した。

【0099】ストレプトアビジン-アルカリフォスファ 50

ターゼ結合体の溶液をTBS-Tween 20を用いて3000倍に希釈した液中で膜を室温下10分間処理した。その後、膜1cm2あたり1mlのTBS-Tween 20溶液中室温下15分間づつ2回洗浄した。さらに最終緩衝液の10倍希釈液中、室温下1時間洗浄した。膜をワットマン3MM濾紙上に置き過剰の緩衝液を除いた後、膜を現像ホルダー中に置いた。ホルダー中の膜に検出試薬を滴下し、膜をホルダーで覆った。そのまま2時間反応させ、X線フィルムあるいはHyper Film (アマシャム社) を挟み、15分間露光させ、現像し、第3図および第4図に示される結果を得た。

【0100】型分け結果

血清学的に明らかにされたDRの型とプローブによって決定されたDRの型を比較して図2乃至図4ならびに表4および表5に示した。この結果から、検体DNAを固定した膜にプローブをハイブリダイズさせた場合、およびプローブを固定した膜に検体DNAをハイブリダイズさせた場合のいずれの場合においても血清学的に決定されたDRの型およびサブタイプを示す結果が得られた。また、血清学的には決定できない型の場合においても、その型を決定できた。

【0101】

【配列表】

配列番号: 1

(1) 配列の長さ: 18

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: genomic DNA

30 (6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではOA3と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

AGXAGXXGXC CACCCGGC 18

配列番号: 2

(1) 配列の長さ: 19

40 (2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: genomic DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではOF10と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列



XGGAAAGACG CGXCCAXAA 19

配列番号: 3

- (1) 配列の長さ: 19
- (2) 配列の型: 核酸
- (3) 鎖の数: 一本鎖
- (4) トポロジー: 直鎖状
- (5) 配列の種類: genomic DNA
- (6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではO A 1 4 1 6と記載される。X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

CAGGAGGAGA ACGXGCGCX 19

配列番号: 4

- (1) 配列の長さ: 19
- (2) 配列の型: 核酸
- (3) 鎖の数: 一本鎖
- (4) トポロジー: 直鎖状
- (5) 配列の種類: genomic DNA
- (6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではO F 3 0と記載される。X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

GACXXCCXGG AAGACGAGC 19

配列番号: 5

- (1) 配列の長さ: 18
- (2) 配列の型: 核酸
- (3) 鎖の数: 一本鎖
- (4) トポロジー: 直鎖状
- (5) 配列の種類: genomic DNA
- (6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではO F 4 4と記載される。X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

CGCGGCCCGC XXCXGXC 18

配列番号: 6

- (1) 配列の長さ: 18
- (2) 配列の型: 核酸
- (3) 鎖の数: 一本鎖
- (4) トポロジー: 直鎖状
- (5) 配列の種類: genomic DNA
- (6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではO F 4 5と記載される。

X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

CCXCGGCCCG CCXCGCX 18

配列番号: 7

(1) 配列の長さ: 18

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: genomic DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではO F 8 6 3と記載される。X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

GCXXCCACA GCCCCGXA 18

配列番号: 8

(1) 配列の長さ: 18

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: genomic DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではO F 8 5 1と記載される。X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

GCGCCXGAX GCCGAGXA 18

配列番号: 9

(1) 配列の長さ: 18

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではA 3と記載される。

(8) 配列

GCCGGTGA CAACTACT 18

配列番号: 10

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

- (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 1 0と記載される。  
 (8) 配列  
 TTATGGACGC GTCITTCCA 19  
 配列番号：1 1  
 (1) 配列の長さ：1 9  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではA 1 4 1 6と記載される。  
 (8) 配列  
 AGCGCAGGTT CTCCTCCTG 19  
 配列番号：1 2  
 (1) 配列の長さ：1 9  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 3 0と記載される。  
 (8) 配列  
 GCTCGTCTTC CAGGAAGTC 19  
 配列番号：1 3  
 (1) 配列の長さ：1 8  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 4 4と記載される。  
 (8) 配列  
 GAGCAGAAGC GGGCCGCG 18  
 配列番号：1 4  
 (1) 配列の長さ：1 8  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖

- (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 4 5と記載される。  
 (8) 配列  
 AGCAGAGGCG GGCCGAGG 18  
 配列番号：1 5  
 10 (1) 配列の長さ：1 8  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 8 6 3と記載される。  
 (8) 配列  
 20 TACGGGGCTG TGGAGAGC 18  
 配列番号：1 6  
 (1) 配列の長さ：1 8  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 30 (7) 配列の特徴：本文中ではF 8 5 1と記載される。  
 (8) 配列  
 TACTCGGCAT CAGGCCGC 18  
 配列番号：1 7  
 (1) 配列の長さ：1 9  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：genomic DNA  
 (6) 起源  
 40 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではO F 1と記載される。X  
 は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを  
 表わす。  
 (8) 配列  
 GCXGGAAGA XGCAXCXAX 19  
 配列番号：1 8  
 (1) 配列の長さ：1 9  
 (2) 配列の型：核酸  
 50 (3) 鎖の数：一本鎖

- (4) トポロジー:直鎖状  
 (5) 配列の種類:genomic DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名:ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴:本文中ではOF 2と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 CXCXGXCAG GAACGCAC 19  
 配列番号:19  
 (1) 配列の長さ:19  
 (2) 配列の型:核酸  
 (3) 鎖の数:一本鎖  
 (4) トポロジー:直鎖状  
 (5) 配列の種類:genomic DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名:ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴:本文中ではOF 3と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 GXCXGCAGXA GXXGCCAC 19  
 配列番号:20  
 (1) 配列の長さ:19  
 (2) 配列の型:核酸  
 (3) 鎖の数:一本鎖  
 (4) トポロジー:直鎖状  
 (5) 配列の種類:genomic DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名:ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴:本文中ではOF 4と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 CCXCCXGGXG AXAGAAGXA 19  
 配列番号:21  
 (1) 配列の長さ:19  
 (2) 配列の型:核酸  
 (3) 鎖の数:一本鎖  
 (4) トポロジー:直鎖状  
 (5) 配列の種類:genomic DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名:ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴:本文中ではOF 7と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

- (8) 配列  
 CCXGGAAAGA CXCCXCXAX 19  
 配列番号:22  
 (1) 配列の長さ:18  
 (2) 配列の型:核酸  
 (3) 鎖の数:一本鎖  
 (4) トポロジー:直鎖状  
 (5) 配列の種類:genomic DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名:ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴:本文中ではOF 8と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 GGCCXGGXG GACCCXA 18  
 配列番号:23  
 (1) 配列の長さ:19  
 (2) 配列の型:核酸  
 (3) 鎖の数:一本鎖  
 (4) トポロジー:直鎖状  
 (5) 配列の種類:genomic DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名:ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴:本文中ではOF 9と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 GGXGCGGXAX CXGCACAGA 19  
 配列番号:24  
 (1) 配列の長さ:19  
 (2) 配列の型:核酸  
 (3) 鎖の数:一本鎖  
 (4) トポロジー:直鎖状  
 (5) 配列の種類:genomic DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名:ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴:本文中ではOF 11と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 CCAGXACXCC XCAXCAGGC 19  
 配列番号:25  
 (1) 配列の長さ:19  
 (2) 配列の型:核酸  
 (3) 鎖の数:一本鎖  
 (4) トポロジー:直鎖状  
 (5) 配列の種類:genomic DNA

- (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではOF 1 3と記載される。  
 X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 CGCXCGXCXX CCAGGAXGX 19  
 配列番号: 2 6  
 (1) 配列の長さ: 1 9  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖  
 (4) トポロジー: 直鎖状  
 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではOF 5 2と記載される。  
 X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 XGGCAAAXA CXGCAGACA 19  
 配列番号: 2 7  
 (1) 配列の長さ: 1 9  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖  
 (4) トポロジー: 直鎖状  
 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではOF 5 2 cと記載される。  
 X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 GAAGXAXXC XCCAGGAAC 19  
 配列番号: 2 8  
 (1) 配列の長さ: 1 9  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖  
 (4) トポロジー: 直鎖状  
 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではOF 5 3と記載される。  
 X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 CXGAXCAGGX XCCACACXC 19

- 配列番号: 2 9  
 (1) 配列の長さ: 1 9  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖  
 (4) トポロジー: 直鎖状  
 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 10 (7) 配列の特徴: 本文中ではOF 1 2 0と記載される。  
 X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 AAGCGCAGGA GCXCCXCCX 19  
 配列番号: 3 0  
 (1) 配列の長さ: 1 9  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖  
 (4) トポロジー: 直鎖状  
 20 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではOF 1 2 1と記載される。  
 X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 (8) 配列  
 GCCXGXCXC CAGGAXGXC 19  
 配列番号: 3 1  
 30 (1) 配列の長さ: 1 9  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖  
 (4) トポロジー: 直鎖状  
 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではOF 1 2 2と記載される。  
 X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。  
 40 (8) 配列  
 CGCCXGXCXX CCAGGAAGX 19  
 配列番号: 3 2  
 (1) 配列の長さ: 1 9  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖  
 (4) トポロジー: 直鎖状  
 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 50 (a) 生物名: ヒト

(b) 株名:  
(7) 配列の特徴:本文中ではOF123と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

GCCXGXCXXC CAGGAGGXC 19

配列番号: 33

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴:本文中ではOF142と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

CGGCCXGAGC CXGAGXACX 19

配列番号: 34

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴:本文中ではOF143と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

GXXCCAGXGC XCCGACGA 19

配列番号: 35

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴:本文中ではOF22と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

CAACAGGAGG ACXXGCCGX 19

配列番号: 36

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴:本文中ではOF29と記載される。

Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

XGCACAGAGG CAXCXAXAA 19

配列番号: 37

(1) 配列の長さ: 20

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

20 (a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴:本文中ではOF42と記載される。

Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

ACGGACXCCX CXXGGXGAXA 20

配列番号: 38

(1) 配列の長さ: 18

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴:本文中ではOF46と記載される。

Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

(8) 配列

40 ACCGGGGCCC GCCXCXGC 18

配列番号: 39

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: genomic DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

50 (7) 配列の特徴:本文中ではOF141と記載され

る。X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

## (8) 配列

CAGGAGGAGX XCGXGCCGX 19

配列番号: 40

(1) 配列の長さ: 18

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: genomic DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではOF158と記載される。X は核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合はTを表わす。

## (8) 配列

AGXACXCGGC GCXAGGCC 18

配列番号: 41

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではF1と記載される。

## (8) 配列

ATAGATGCAT CTTTCAGC 19

配列番号: 42

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではF2と記載される。

## (8) 配列

GTCCGGTTCC TGCACAGAG 19

配列番号: 43

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではF3と記載される。

## (8) 配列

GTGGACAACCT ACTGCAGAC 19

配列番号: 44

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

10 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではF4と記載される。

## (8) 配列

TACTCTATC ACCAAGAGG 19

配列番号: 45

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

20 (3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではF7と記載される。

## (8) 配列

ATAGAAGAGT CTTTCAGG 19

配列番号: 46

30 (1) 配列の長さ: 18

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

(7) 配列の特徴: 本文中ではF8と記載される。

## (8) 配列

40 TAGGTGTCCA CCAGGGCC 18

配列番号: 47

(1) 配列の長さ: 19

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA

(6) 起源

(a) 生物名: ヒト

(b) 株名:

50 (7) 配列の特徴: 本文中ではF9と記載される。

(8) 配列  
TCTGTGCAGA TACCGCACC 19  
配列番号: 4 8  
(1) 配列の長さ: 1 9  
(2) 配列の型: 核酸  
(3) 鎖の数: 一本鎖  
(4) トポロジー: 直鎖状  
(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
(6) 起源  
(a) 生物名: ヒト  
(b) 株名:  
(7) 配列の特徴: 本文中では F 1 1 と記載される。  
(8) 配列  
GCCTGATGAG GAGTACTGG 19  
配列番号: 4 9  
(1) 配列の長さ: 1 9  
(2) 配列の型: 核酸  
(3) 鎖の数: 一本鎖  
(4) トポロジー: 直鎖状  
(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
(6) 起源  
(a) 生物名: ヒト  
(b) 株名:  
(7) 配列の特徴: 本文中では F 1 3 と記載される。  
(8) 配列  
ACATCCTGGA AGACGAGCG 19  
配列番号: 5 0  
(1) 配列の長さ: 1 9  
(2) 配列の型: 核酸  
(3) 鎖の数: 一本鎖  
(4) トポロジー: 直鎖状  
(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
(6) 起源  
(a) 生物名: ヒト  
(b) 株名:  
(7) 配列の特徴: 本文中では F 5 2 と記載される。  
(8) 配列  
TGTCTGCAGT AATTGTCCA 19  
配列番号: 5 1  
(1) 配列の長さ: 1 9  
(2) 配列の型: 核酸  
(3) 鎖の数: 一本鎖  
(4) トポロジー: 直鎖状  
(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
(6) 起源  
(a) 生物名: ヒト  
(b) 株名:  
(7) 配列の特徴: 本文中では F 5 2 c と記載される。  
(8) 配列  
GTTCTGGAG AGATACTTC 19

配列番号: 5 2  
(1) 配列の長さ: 1 9  
(2) 配列の型: 核酸  
(3) 鎖の数: 一本鎖  
(4) トポロジー: 直鎖状  
(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
(6) 起源  
(a) 生物名: ヒト  
(b) 株名:  
10 (7) 配列の特徴: 本文中では F 5 3 と記載される。  
(8) 配列  
GAGTGTGGA CCTGATCAG 19  
配列番号: 5 3  
(1) 配列の長さ: 1 9  
(2) 配列の型: 核酸  
(3) 鎖の数: 一本鎖  
(4) トポロジー: 直鎖状  
(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
(6) 起源  
20 (a) 生物名: ヒト  
(b) 株名:  
(7) 配列の特徴: 本文中では F 1 2 0 と記載される。  
(8) 配列  
AGGAGGAGCT CCTGCGCTT 19  
配列番号: 5 4  
(1) 配列の長さ: 1 9  
(2) 配列の型: 核酸  
(3) 鎖の数: 一本鎖  
(4) トポロジー: 直鎖状  
30 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
(6) 起源  
(a) 生物名: ヒト  
(b) 株名:  
(7) 配列の特徴: 本文中では F 1 2 1 と記載される。  
(8) 配列  
GACATCCTGG AAGACAGGC 19  
配列番号: 5 5  
(1) 配列の長さ: 1 9  
(2) 配列の型: 核酸  
40 (3) 鎖の数: 一本鎖  
(4) トポロジー: 直鎖状  
(5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
(6) 起源  
(a) 生物名: ヒト  
(b) 株名:  
(7) 配列の特徴: 本文中では F 1 2 2 と記載される。  
(8) 配列  
ACTTCTGGA AGACAGGCG 19  
配列番号: 5 6  
50 (1) 配列の長さ: 1 9

57

- (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 1 2 3と記載される。  
 (8) 配列  
 GACCTCCTGG AAGACAGGC 19  
 配列番号：5 7  
 (1) 配列の長さ：1 9  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 1 4 2と記載される。  
 (8) 配列  
 AGTACTCAGC ATCAGGCCG 19  
 配列番号：5 8  
 (1) 配列の長さ：1 9  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 1 4 3と記載される。  
 (8) 配列  
 TGCTCGGAG CACTGGAAC 19  
 配列番号：5 9  
 (1) 配列の長さ：1 9  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 2 2と記載される。  
 (8) 配列  
 AGCGCAAGTC CTCCTGTTG 19  
 配列番号：6 0  
 (1) 配列の長さ：1 9  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖

58

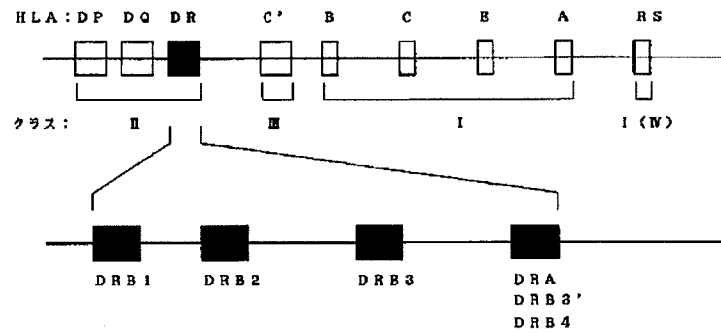
- (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 2 9と記載される。  
 (8) 配列  
 TTATAGATGC CTCGTGCA 19  
 配列番号：6 1  
 10 (1) 配列の長さ：2 0  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 4 2と記載される。  
 (8) 配列  
 20 TATCACCAAG AGGAGTCCGT 20  
 配列番号：6 2  
 (1) 配列の長さ：1 8  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 30 (7) 配列の特徴：本文中ではF 4 6と記載される。  
 (8) 配列  
 GCAGAGGCGG GCCGCGGT 18  
 配列番号：6 3  
 (1) 配列の長さ：1 9  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 40 (a) 生物名：ヒト  
 (b) 株名：  
 (7) 配列の特徴：本文中ではF 1 4 1と記載される。  
 (8) 配列  
 AGCGCACGAA CTCCTCCTG 19  
 配列番号：6 4  
 (1) 配列の長さ：1 8  
 (2) 配列の型：核酸  
 (3) 鎖の数：一本鎖  
 (4) トポロジー：直鎖状  
 50 (5) 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド DNA



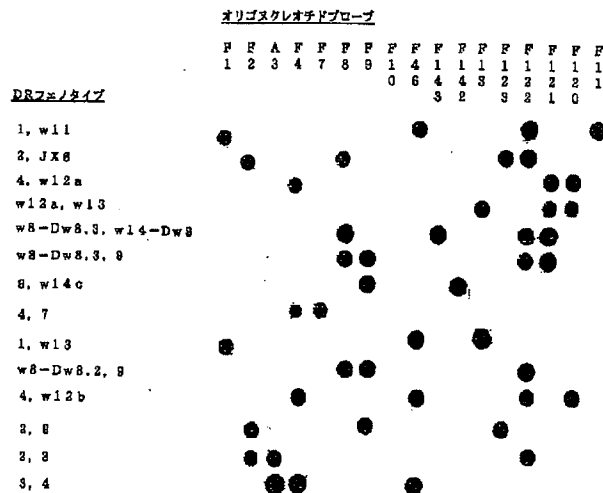
- (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではF158と記載される。  
 (8) 配列  
 GGCCTAGCGC CGAGTACT 18  
 配列番号: 65  
 (1) 配列の長さ: 25  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖 (4) トポロジー: 直鎖状  
 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではFPR1と記載される。  
 【0102】配列中、T(C)はTとCの混合物を意味する。  
 (8) 配列  
 AGTGTCAATT CTCAAT(C)GGG ACCCA 25  
 配列番号: 66  
 (1) 配列の長さ: 20  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖  
 (4) トポロジー: 直鎖状  
 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではDRβAMP1と記載される。  
 (8) 配列  
 CGCTGCACTG TCAAGCTCTC 20  
 配列番号: 67  
 (1) 配列の長さ: 27  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖  
 (4) トポロジー: 直鎖状  
 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト

- (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではGH46と記載される。  
 (8) 配列  
 CCGGATCCTT CGTGTCCCA CAGCACG 27  
 配列番号: 68  
 (1) 配列の長さ: 19  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖  
 (4) トポロジー: 直鎖状  
 (5) 配列の種類: genomic DNA  
 (6) 起源  
 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではOK1406と記載される。Xは核酸がRNAの場合はU、核酸がDNAの場合にはTを表わす。  
 (8) 配列  
 AACCAGGAGG AGAACGXGC 19  
 配列番号: 69  
 (1) 配列の長さ: 19  
 (2) 配列の型: 核酸  
 (3) 鎖の数: 一本鎖  
 (4) トポロジー: 直鎖状  
 (5) 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド DNA  
 (6) 起源 (a) 生物名: ヒト  
 (b) 株名:  
 (7) 配列の特徴: 本文中ではK1406と記載される。  
 (8) 配列:  
 GCACGTCTC CTCCTGGTT 19  
 【図面の簡単な説明】  
 【図1】オリゴヌクレオチドプローブでHLA抗原遺伝子の構造を示す図。  
 【図2】オリゴヌクレオチドプローブを用いるハイブリダイゼーションによるタイピングの結果を示す図。  
 【図3】オリゴヌクレオチドプローブを用いるハイブリダイゼーションによるタイピングの結果を示す図。  
 【図4】オリゴヌクレオチドプローブを用いるハイブリダイゼーションによるタイピングの結果を示す。

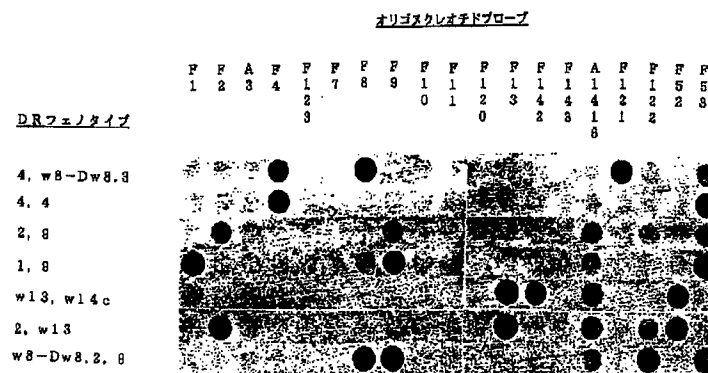
【图 1】



【図 3】



【図4】



【図2】

オリゴヌクレオチドグループ									
提供者名	アミノ酸タイプ		DRB遺伝子型						
	DR	D			F12	F14	F11	F120	F121
AU	1,w11	w1,w5	B1*0101,B1*11(01/04)		●		●		
MO	1,w13	w1,w19	B1*0101,B1*13(01/02)		●				
8CF	w15(2),w17(3)	w2,nd	B5*0101,B1*0301						
ST	w15(2),blank	w2,nd	B5*0101,B1-JK6						
9CF	w15(2),w8	w12,w8,3-	B5*0102,B1*0801						
56M	w15(2),4	w12,nd	B5*0102,B1*0401						
12M	4,w14	nd,nd	B1*04(03/07),B1*1401						
38H	4,w14	w15,nd	B1*0405,B1-14c						
MS	4,w11	w15,w5	B1*0405,B1*11(01/04)		●		●		
TK	4,7	KT2,w17	B1*0406,B1*07(01/02)		●				
KI	4,w12	w15,nd	B1*0405,B1-12b						
YAH	blank,w12	nd,nd	B1-JK6,B1*1201						
NI	w10,w12	nd,nd	B1*1001,B1*1201						
13H	w13,w14	nd,nd	B1*13(01/02),B1-14c						
75H	w8,w14	nd,nd	B1*0803,B1*1402						
KY	w8,9	nd,nd	B1*0802,B1*0901						
KU	9,w14	w23,w9	B1*0901,B1*1401						
SI	9,w16(2)	nd,nd	B1*0901,B5*0202						

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>5</sup>

G 0 1 N 33/53

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

D 8310-2 J

K 8310-2 J

(72)発明者 宮越 照一

千葉県袖ヶ浦市長浦字拓二号580番32

**CLAIMS**

---

**[Claim(s)]**

[Claim 1]An oligonucleotide probe for gene typing of an HLA-DR antigen for detecting one sort of a nucleic acid base sequence expressed with the following array number 1 thru/or the array number 8, or two sorts or more.

0A3:. Nucleic acid base sequence 0Fof array number 1 statement 10:. Nucleic acid base sequence 0Aof array number 2 statement 1416:. Nucleic acid base sequence 0.K. of array number 3 statement 1406:. Nucleic-acid-base-sequence 0F851 of nucleic-acid-base-sequence 0F863:array-number 7 statement of nucleic-acid-base-sequence 0F45:array-number 6 statement of nucleic-acid-base-sequence 0F44:array-number 5 statement of nucleic-acid-base-sequence 0F30:array-number 4 statement of array-number 68 statement: A nucleic acid base sequence of array number 8 statement

[Claim 2]An oligonucleotide probe for gene typing of an HLA-DR antigen containing one sort of a nucleic acid base sequence expressed with the following array number 9 thru/or the array number 16, or two sorts or more.

A3:. Nucleic acid base sequence Fof array number 9 statement 10:. Nucleic acid base sequence Aof array number 10 statement 1416:. Nucleic acid base sequence Kof array number 11 statement 1406:. The nucleic acid base sequence F851 of nucleic-acid-base-sequence F863:array-number 15 statement of nucleic-acid-base-sequence F45:array-number 14 statement of nucleic-acid-base-sequence F44:array-number 13 statement of nucleic-acid-base-sequence F30:array-number 12 statement of array-number 69 statement: A nucleic acid base sequence of array number 16 statement

[Claim 3]An oligonucleotide probe for gene typing of an HLA-DR antigen detecting one sort of a nucleic acid base sequence which is expressed with the following array number 17 thru/or the array number 40 in addition to the nucleic acid base sequence according to claim 1, or two sorts or more.

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application]This invention, The gene typing kit containing the

reagent kit and the instrument to be used for gene typing containing the oligonucleotide probe aiming at gene typing performed for the base sequence which encodes the inner DR antigen of a human leukocyte antigen, and this oligonucleotide probe, Furthermore, it is related with the method of typing of the DR antigen of the human leukocyte antigen using these.

[0002]

[Description of the Prior Art]In the judgment of not only as opposed to the judgment of the conformity at the time of an organ transplantation but the illness in typing (mold division) of a human leukocyte antigen (it abbreviates to HLA) of individual susceptibility, etc., the importance attracts attention. When it is the renal transplantation with high frequency in our country, by the kidney transplant from a living donor from which a blood relationship person becomes a donor, and the cadaveric renal transplantation from a non-blood relationship person, goodness of fit differed and the direction of kidney transplant from a living donor has dedicated good results. This in existence of the subtype which cannot be identified with the conventional serological typing. Or other loci to chain suggest a possibility of having influenced the take of a transplant (a metabolic turnover highlight, 25 metabolic turnovers, a special issue, Yuichi Yamamura and Kazu Yoshitoshi editorial supervision, 373 - 380 pages, Tokyo, Nakayama Shoten issue).

[0003]Serological typing adds the clear antiserum of singularity to the lymphocyte of a retrieval object with complement, and is performed by investigating whether injury of the cell is carried out. Since this method cannot identify the delicate difference in the antigenic determinant of the HLA antigen molecule of a simple thing, it may overlook existence of a subtype. Another fault of serological typing is that undetected HLA also exists with serological typing. it is said that this rate occupies the ratio of 11% in a Japanese group (Baur M.P., Neugebauer M., Deppe Sigmund M., Luton T., Mayer W.R., Albert E.D. et al..) This will be a number which are in Histocompatibilitytesting 1984. Berlin, Springer-Verlag, and 333-page 1984.

[0004]However, while the cadaveric renal transplantation from a non-blood relationship person increases, the actual condition cannot examine organization goodness of fit in detail only with the conventional serological typing.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] An HLA antigen is divided roughly into class I antigens and a class II antigen. If the renal transplantation is mentioned as an example, it is suggested that coincidence of a class II antigen is important for take. The class II antigen comprises three sorts of antigens, DR, DQ, and DP, and is made important [ the conformity of the DR antigen revealed most on the cell membrane surface also in this ].

[Hiroshi Amemiya, Masaharu Sata: The Aizawa group renal transplantation, the total of conformity, the grants-in-aid for scientific research in the Showa 58 fiscal year [General research (A)] Result-of-research report: The composition of a HLA-D field, a function, 67 pages, 1984] .

[0006] The HLA-DR molecule has the largest hereditary point of difference in a human class II molecule. namely, 18 sorts of HLA-DR (from DR1 up to DRw18) -- and -- It is defined by the result of the lymphocyte test (CDL) of the serological singularity of two sorts of HLA-DRw (DRw52 and DRw53), and, It is defined by the result of the mixed lymphocyte examination (MLR) of the cell singularity of 26 sorts of HLA-D (from Dw1 up to Dw26). (Bodmer W.F., Alberet E., Bodmer J.G. and others, Histocompatibility Testing 1987 .New York, Springer-Verlag, 72 page 1989)

By the 2nd exon part of the DRB gene (B1, B3, B4, and B5) in which DR and almost all D singularity encode the 1st domain of DR beta chain by base sequence analysis of HLA-DRA and -DRB gene. it has turned out that it is determined (Flomenberg, N., and HistocompatibilityTesting 1987. --) [ New York and ] Spriger-Verlag, 532 pages 1989 .Bodmer J.G., Marsh S.G.E. and others, and 35 Tissue Antigens 1 page 1990. 5-6 attribution of the result of base analysis to DRB allele -- existence of an unknown variation thing is clarified. Bodmer J.G., Marsh S.G.E., Parham P. et al.. 35 Tissue Antigens 1 page 1990 .Abe A., Ito I., Ohkubo M. et al., 30 Immunogenetics(es) 422 pages 1989 .Obata F., Abe A., Ohkubo M. et al., 27 Hum Immunol 269 pages 1990 .Petersdorf E.W., Griffith R.L., Erlich H.A. et al., 32 Immunogenetics(es) 96-page 1990 .Obata F., Ito I., Ito K. et al. 32 Immunogenetics(es) 313 pages 1990

The DRB allele more than the number detected by an immunological means came to be known through these circumstances. As such an example, 38 sorts of DRB1 allele, four sorts of DRB3 allele, one sort of DRB4 allele, and four sorts of DRB5 allele can be mentioned. (Bodmer J.G., Marsh S.G.E., Parham

P. and others, 35 Tissue Antigens 1 page 1990) Therefore, it cannot be overemphasized that the typing method for the ability to classify an HLA-DR antigen precisely is important. However, the typing result satisfied not necessarily depending on the conventional method by a serological method is not obtained, but it must be said from clinical viewpoints of an organ transplantation etc. that the conventional serological typing is insufficient.

[0007]With serological typing, an object of this invention is to provide the inspection reagents for gene typing for distinguishing almost all molds including an HLA-DR antigen molecule with difficult discernment. The oligonucleotide probe group which makes it possible to also carry out discernment of the subtype of an HLA-DR antigen molecule precisely especially in more detail, And it aims at providing the gene typing kit containing the inspection reagent containing an oligonucleotide probe group and an instrument and the method of new typing, using this reagent further.

[0008]

[Means for Solving the Problem]This invention relates to each DNA sequence of these antigen molecules at a specific oligonucleotide probe group also including a subtype and a thing serologically called a blank of an HLA-DR antigen molecule which cannot be divided with serological typing.

[0009]This invention persons came to think that typing detailed beyond the actual condition is possible, and a fault of serological typing can also be canceled, when a blank or a subtype could be typed on a gene level also in an HLA-DR antigen. It is the method of determining a type of a DR antigen by whether an oligonucleotide probe which can be specifically crossed to a specific base sequence equivalent to each antigen determination part which specifically exists in a field which is rich in genetic polymorphism of a DR antigen being produced, and a gene of a sample crossing to it.

[0010]Then, according to such a view, the comparative examination of the base sequence various DRB type was carried out, and a base sequence peculiar to each type was searched. As a result, differences in a base sequence including a subtype and a mold with serologically difficult distinction were accepted. Based on these base sequences, a specific oligonucleotide probe was produced at each DR antigen gene including a new oligonucleotide probe. As a result of performing gene typing using these probes, a mold

of almost all DRB(s) was able to be distinguished.

[0011] That is, this invention is an oligonucleotide probe for gene typing of an HLA-DR antigen for detecting one sort of a nucleic acid base sequence expressed with the following array number 1 thru/or the array number 8, or two sorts or more.

0A3:. Nucleic acid base sequence 0Fof array number 1 statement 10:. Nucleic acid base sequence 0Aof array number 2 statement 1416:. Nucleic acid base sequence 0.K. of array number 3 statement 1406:. nucleic acid base sequence 0F30: of array number 68 statement -- a nucleic acid base sequence of nucleic acid base sequence 0F851:array number 8 statement of nucleic acid base sequence 0F863:array number 7 statement of nucleic acid base sequence 0F45:array number 6 statement of nucleic acid base sequence 0F44:array number 5 statement of array number 4 statement. This invention is an oligonucleotide probe for gene typing of an HLA-DR antigen containing one sort of a nucleic acid base sequence expressed with the following array number 9 thru/or the array number 16, or two sorts or more.

A3:. Nucleic acid base sequence Fof array number 9 statement 10:. Nucleic acid base sequence Aof array number 10 statement 1416:. Nucleic acid base sequence Kof array number 11 statement 1406:. nucleic acid base sequence F30: of array number 69 statement -- a nucleic acid base sequence of nucleic acid base sequence F851:array number 16 statement of nucleic acid base sequence F863:array number 15 statement of nucleic acid base sequence F45:array number 14 statement of nucleic acid base sequence F44:array number 13 statement of array number 12 statement. This invention One sort of a nucleic acid base sequence of the array number 1 thru/or the array number 8. Or it is an oligonucleotide probe for gene typing of an HLA-DR antigen detecting one sort of a nucleic acid base sequence which is expressed with the following array number 17 thru/or the array number 40 in addition to two or more sorts, or two sorts or more.

0F1:. Nucleic acid base sequence 0Fof array number 17 statement 2:. Nucleic acid base sequence 0Fof array number 18 statement 3:. Nucleic acid base sequence 0Fof array number 19 statement 4:. Nucleic acid base sequence 0Fof array number 20 statement 7:. Nucleic acid base sequence 0Fof array number 21 statement 8:. Nucleic acid base sequence 0Fof array number 22 statement 9:. Nucleic acid base sequence 0Fof array number 23 statement 11:. Nucleic acid base sequence 0Fof array number 24 statement 13:. Nucleic acid base



sequence OFof array number 25 statement 52:. Nucleic acid base sequence OF52of array number 26 statement c:. Nucleic acid base sequence OFof array number 27 statement 53:. Nucleic acid base sequence OFof array number 28 statement 120:. Nucleic acid base sequence OFof array number 29 statement 121:. Nucleic acid base sequence OFof array number 30 statement 122:. Nucleic acid base sequence OFof array number 31 statement 123:. Nucleic acid base sequence OFof array number 32 statement 142:. Nucleic acid base sequence OFof array number 33 statement 143:. Nucleic acid base sequence OFof array number 34 statement 22:. nucleic acid base sequence OF29: of array number 35 statement -- a nucleic acid base sequence of nucleic acid base sequence OF158:array number 40 statement of nucleic acid base sequence OF141:array number 39 statement of nucleic acid base sequence OF46:array number 38 statement of nucleic acid base sequence OF42:array number 37 statement of array number 36 statement. This invention One sort of the array number 9 thru/or the array number 16. Or it is an oligonucleotide probe for gene typing of an HLA-DR antigen containing one sort of an oligonucleotide probe which is expressed with a nucleic acid base sequence of the following array number 41 thru/or the array number 64 in addition to two or more sorts of oligonucleotide probes, or two sorts or more.

F1:. Nucleic acid base sequence Fof array number 41 statement 2:. Nucleic acid base sequence Fof array number 42 statement 3:. Nucleic acid base sequence Fof array number 43 statement 4:. Nucleic acid base sequence Fof array number 44 statement 7:. Nucleic acid base sequence Fof array number 45 statement 8:. Nucleic acid base sequence Fof array number 46 statement 9:. Nucleic acid base sequence Fof array number 47 statement 11:. Nucleic acid base sequence Fof array number 48 statement 13:. Nucleic acid base sequence Fof array number 49 statement 52:. Nucleic acid base sequence F52of array number 50 statement c:. Nucleic acid base sequence Fof array number 51 statement 53:. Nucleic acid base sequence Fof array number 52 statement 120:. Nucleic acid base sequence Fof array number 53 statement 121:. Nucleic acid base sequence Fof array number 54 statement 122:. Nucleic acid base sequence Fof array number 55 statement 123:. Nucleic acid base sequence Fof array number 56 statement 142:. Nucleic acid base sequence Fof array number 57 statement 143:. Nucleic acid base sequence Fof array number 58 statement 22:. nucleic acid base sequence F29: of array number 59 statement -- a nucleic acid base sequence of nucleic acid base sequence F158:array

number 64 statement of nucleic acid base sequence F141:array number 63 statement of nucleic acid base sequence F46:array number 62 statement of nucleic acid base sequence F42:array number 61 statement of array number 60 statement. In an oligonucleotide probe given in the above this invention, It is an oligonucleotide probe for gene typing of an HLA-DR antigen including a base sequence of ten bases which continued at least.

[0012]This invention is an oligonucleotide probe given in one of the above not crossing to a base sequence of a chromosomal gene except an oligonucleotide probe of a statement encoding HLA-DR in the above, or complementary DNA. An oligonucleotide probe of a statement to the above this invention Radioisotope or/, and fluorescence, It is the oligonucleotide probe of one of the above which carrying out the sign by a substance which can cause either phenomenon of luminescence and coloring, or embellishing so that a sign may be carried out with this substance.

[0013]This invention is an oligonucleotide probe of one of the above, wherein an oligonucleotide including a base sequence of ten bases by which an oligonucleotide probe of a statement followed the above at least is being fixed to a film etc. This invention is the method of gene typing of an HLA-DR antigen using an oligonucleotide probe given in the above for detection which made a sample hair of people's blood or/and tunica mucosa oris or/, and hair or/, and a nail.

[0014]It is trischloride buffer solution, wherein it is used when this invention obtains DNA from a sample for performing gene typing of an HLA-DR antigen, and it contains potassium chloride, a magnesium chloride, gelatin, a surface-active agent, and the protease K. Inside of DNA which encodes an HLA-DR antigen in which this invention is obtained from said sample, It is a field which includes a base sequence of said oligonucleotide probe at least, And it is a solution containing sample DNA and this DNA embellishing so that the sign of the part may be carried out or a sign may be carried out by this substance at least by a substance which can cause one phenomenon of radioisotope or/and fluorescence, luminescence, and coloring.

[0015]This invention is an amplification method of a base sequence which encodes an HLA-DR antigen which amplifies subregion which includes a base sequence of one oligonucleotide of the above among base sequences which encode an HLA-DR antigen by a following method.

(1) A chromosomal DNA which encodes HLA-DR which carried out the DENEI char to an oligonucleotide primer by heat-treatment under heat-resistant DNA polymerase existence is annealed, (2) Heat-treat and carry out the primer extension of the annealed DNA, and it is (3). (1) And (2) A step is repeated.

[0016] This invention an amplification reaction Radioisotope and/, or fluorescence, It is the above-mentioned amplification method carrying out using an oligonucleotide primer which the sign is carried out by a substance which can cause either phenomenon of luminescence and coloring, or is embellished so that a sign may be carried out with this substance. This invention this amplification reaction Radioisotope and/, or fluorescence, It is the above-mentioned amplification method carrying out using nucleic acid embellished so that the sign may be carried out or a sign may be carried out by this substance by a substance which can cause either phenomenon of coloring and luminescence, and making one of the above carry out hybridization to an oligonucleotide of a statement.

[0017] This invention is an oligonucleotide primer as which a base sequence of an oligonucleotide primer of a statement is expressed in the array number 65 or the array number 66 to the above.

FPR1: -- nucleic acid base sequence DRbetaAMP1: given in the array number 65 -- a nucleic acid base sequence given in the array number 66. This invention is what is used when performing a DNA amplification reaction, in order to perform gene typing of an HLA-DR antigen, They are tris and chloride buffer solution containing potassium chloride, a magnesium chloride, gelatin, dGTP, dCTP, dTTP, dATP, and the above-mentioned oligonucleotide primer.

[0018] This invention is what is used when carrying out hybridization of said DNA to an oligonucleotide probe of the above-mentioned statement, They are tetramethylammonium, sodium ethylenediaminetetraacetate, DENHARUTO liquid, sodium dodecyl sulfate, and trischloride buffer solution containing carrier DNA. This invention is what is used for washing after carrying out hybridization of the DNA of a sample to an oligonucleotide probe of the above-mentioned statement, They are tetramethylammonium, sodium ethylenediaminetetraacetate, DENHARUTO liquid, and trischloride buffer solution containing sodium dodecyl sulfate.

[0019] This invention An oligonucleotide probe of the above-mentioned statement, the above-mentioned written oligonucleotide primer, It is a

reagent kit for gene typing of an HLA-DR antigen consisting of at least two or more kinds of structures which contain this oligonucleotide probe among buffer solution of the above-mentioned statement. This invention to a reagent kit of the above-mentioned statement An object for gene extraction processing, for DNA amplification reactions, It is a test kit for gene typing of an HLA-DR antigen which adding all or a part of instrument which needs an object for hybridization, an object for washing after hybridization, a tube for a detection reaction, etc., and constituting.

[0020] It is the method of gene typing of an HLA-DR antigen, wherein this invention uses a reagent kit or a test kit of an oligonucleotide probe and the above-mentioned statement which faces performing gene typing of an HLA-DR antigen, and is expressed with a base sequence group of a statement to the above. Next, a DNA sequence and a typing method equivalent to a detection part specific in each type among gene sequences which encode a HLA-DR molecule concerning this invention are explained concretely.

[0021] A DNA sequence equivalent to a detection part of a gene which encodes HLA-DR concerning this invention is a base sequence of a field called a hypervariable region. Although HLA-related gene compositions are shown in drawing 1, Specific arrangement was selected out of a base sequence including a hypervariable region in a DRB field in this, a new oligonucleotide probe was developed, and it made it possible to type each type precisely by combining them further.

[0022] genotype which cannot be detected by a Prior art about a probe -- or, although an oligonucleotide probe is already announced, Since a hybridization reaction with other genotypes occurs in high frequency in this probe, it is based on a nucleic acid base sequence of various DRB allele of a DRB gene it is already reported that a difficult thing is by judgment at the time of detection, Specific arrangement was searched from the base sequence, and a base sequence which consists of eight kinds was made detectable.

[0023] A target sequence of these oligonucleotide probes, So that as small a number as possible of oligonucleotides may be used and as much DR type as possible can be identified, Specific arrangement was chosen for both a coding strand and the non-coding strand so that a chance of GT mismatch which are the main causes of producing a pair which was wrong between an oligonucleotide probe and the non-target DRB type might be reduced. Thus,

target sequence groups of a selected oligonucleotide probe are enumerated below.

0A3:. Nucleic acid base sequence OFof array number 1 statement 10:. Nucleic acid base sequence 0Aof array number 2 statement 1416:. Nucleic acid base sequence 0.K. of array number 3 statement 1406:. Nucleic acid base sequence OF851 of nucleic acid base sequence OF863:array number 7 statement of nucleic acid base sequence OF45:array number 6 statement of nucleic acid base sequence OF44:array number 5 statement of nucleic acid base sequence OF30:array number 4 statement of array number 68 statement : a base sequence of the nucleic acid base sequence above of array number 8 statement. The oligonucleotide probe for detecting is as follows.

A3:. Nucleic acid base sequence Fof array number 9 statement 10:. Nucleic acid base sequence Aof array number 10 statement 1416:. Nucleic acid base sequence Kof array number 11 statement 1406:. Nucleic acid base sequence Fof array number 69 statement 30:. a nucleic acid base sequence of nucleic acid base sequence F851:array number 16 statement of nucleic acid base sequence F863:array number 15 statement of nucleic acid base sequence F45:array number 14 statement of nucleic acid base sequence F44:array number 13 statement of array number 12 statement -- by using an oligonucleotide probe of these, The following genotype can be easily judged now.

A3 : -- nucleic acid base sequence given in the array number 9 . : B1\*0301 and B1\*0302F10. : given in array number 10 nucleic acid base sequence: -- B1\*1001A1416: -- given in array number 11 nucleic acid base sequence: -- B1\*0302, B1\*1402, B1-JX6, and nucleic acid base sequence:B1\*0302 [ given in the B3\*0301K1406:array number 69 ]. B1\*1402, B1-JX6, and B3\*0301F30. A nucleic acid base sequence given in the array number 12 : : B1\*1103F44. A nucleic acid base sequence given in the array number 13 : : B1\*0401F45. A nucleic acid base sequence given in the array number 14 : : B1\*0403, B1\*0406 and B1\*0407F863. A nucleic acid base sequence given in the array number 15 : : B1\*0102, B1\*1201 and B1-12b and B5\*0201, B5\*0202F851. :. To the array number 16. A nucleic acid base sequence of a statement : B1\*0101, B1\*0102, B1\*0103, B1\*0301, B1\*0302, B1\*0401, B1\*0402, B1\*0403, B1\*0404, B1\*0406, B1\*0407, B1\*0408, B1\*0802, B1\*1001, B1\*1301, B1\*1302, B1\*1402, B1-JX6, B1-PEV, B3\*0201, and B3\*0202 -- including these new oligonucleotide probes, It came to be possible to compound 32 sorts of

different oligonucleotide probes for gene typing of a Japanese HLA-DR antigen, and to identify DR type and a DRB type.

OF1:. Nucleic acid base sequence OFof array number 17 statement 2:. Nucleic acid base sequence OFof array number 18 statement 3:. Nucleic acid base sequence OAof array number 19 statement 3:. Nucleic acid base sequence OFof array number 1 statement 4:. Nucleic acid base sequence OFof array number 20 statement 7:. Nucleic acid base sequence OFof array number 21 statement 8:. Nucleic acid base sequence OFof array number 22 statement 9:. Nucleic acid base sequence OFof array number 23 statement 10:. Nucleic acid base sequence OFof array number 2 statement 11:. Nucleic acid base sequence OFof array number 24 statement 13:. Nucleic acid base sequence OFof array number 25 statement 52:. Nucleic acid base sequence OF52of array number 26 statement c:. Nucleic acid base sequence OAof array number 27 statement 1416:. Nucleic acid base sequence OFof array number 3 statement 53:. Nucleic acid base sequence OFof array number 28 statement 120:. Nucleic acid base sequence OFof array number 29 statement 121:. Nucleic acid base sequence OFof array number 30 statement 122:. Nucleic acid base sequence OFof array number 31 statement 123:. Nucleic acid base sequence OFof array number 32 statement 142:. Nucleic acid base sequence OF42 of nucleic acid base sequence OF30:array number 4 statement of nucleic acid base sequence OF29:array number 36 statement of nucleic acid base sequence OF22:array number 35 statement of nucleic acid base sequence OF143:array number 34 statement of array number 33 statement : The nucleic acid base sequence OF of array number 37 statement. 44:. Nucleic acid base sequence OFof array number 5 statement 45:. Nucleic-acid-base-sequence OF851 of nucleic-acid-base-sequence OF863:array-number 7 statement of nucleic-acid-base-sequence OF158:array-number 40 statement of nucleic-acid-base-sequence OF141:array-number 39 statement of nucleic-acid-base-sequence OF46:array-number 38 statement of array-number 6 statement: Nucleic acid base sequence of array number 8 statement ..... [A]

F1:. Nucleic acid base sequence Fof array number 41 statement 2:. Nucleic acid base sequence Fof array number 42 statement 3:. Nucleic acid base sequence A3of array number 43 statement :. Nucleic acid base sequence Fof array number 9 statement 4:. Nucleic acid base sequence Fof array number 44 statement 7:. Nucleic acid base sequence Fof array number 45 statement

8:. Nucleic acid base sequence Fof array number 46 statement 9:. Nucleic acid base sequence Fof array number 47 statement 10:. Nucleic acid base sequence Fof array number 10 statement 11:. Nucleic acid base sequence Fof array number 48 statement 13:. Nucleic acid base sequence Fof array number 49 statement 52:. Nucleic acid base sequence F52of array number 50 statement c:. Nucleic acid base sequence Aof array number 51 statement 1416:. Nucleic acid base sequence Fof array number 11 statement 53:. Nucleic acid base sequence Fof array number 52 statement 120:. Nucleic acid base sequence Fof array number 53 statement 121:. Nucleic acid base sequence Fof array number 54 statement 122:. Nucleic acid base sequence Fof array number 55 statement 123:. Nucleic acid base sequence Fof array number 56 statement 142:. Nucleic acid base sequence Fof array number 57 statement 143:. The nucleic acid base sequence F45 of nucleic acid base sequence F44:array number 13 statement of nucleic acid base sequence F42:array number 61 statement of nucleic acid base sequence F30:array number 12 statement of nucleic acid base sequence F29:array number 60 statement of nucleic acid base sequence F22:array number 59 statement of array number 58 statement :  
 \*\*. The nucleic acid base sequence F851 of nucleic-acid-base-sequence F863:array-number 15 statement of nucleic-acid-base-sequence F158:array-number 64 statement of nucleic-acid-base-sequence F141:array-number 63 statement of nucleic-acid-base-sequence F46:array-number 62 statement of column-index 14 statement: Nucleic acid base sequence of array number 16 statement ..... [B]

A nucleic acid base sequence shown in the above-mentioned array number 1 thru/or the array number 8. And in a DNA probe group which is the oligonucleotide indicated at a nucleic-acid-probe group and the above-mentioned formula [B] which detect a base sequence group indicated at an above-mentioned ceremony [A] containing a new oligonucleotide DNA probe shown in the array number 9 thru/or the array number 16, A nucleic acid probe for DR typing of HLA including a nucleic acid base sequence of at least 10 continuous bases required in order to cause a hybridization reaction may be used.

[0024]DR type serologically determined that it will use these probe groups is judged as a positivity by at least one of the 32 above-mentioned sorts of oligonucleotides. Most DRB types accompanying special cell D singularity can be identified in combination of a kind of oligonucleotide or an

oligonucleotide. For example, with an immunological reagent which can be obtained easily at present, although some DRB types, such as DRB1-12b, DRB1-14c, and DRB1-JX6, are difficult to identify, identification of them is attained by our oligonucleotide typing also including these. DR type which a DNA probe which is an oligonucleotide used for below in this invention can identify was indicated collectively.

[0025]F1: A nucleic acid base sequence of array-number 41 statement:

Nucleic acid base sequence:DR2 of DR1, B1\*0101, B1\*0102, and

B1\*0103F2:array number 42 statement, B5\*0101, B5\*0102, B5\*0201, B5\*0202 (Obata.), F., AbeA., Ohkubo M. and others, and 27 Hum Immunol 269 pages - 284 pages 1990

A3 : A nucleic acid base sequence of array number 9 statement. (F3:.) Nucleic acid base sequence of array number 43 statement :. DR3, B1\*0301, B1\*0302F4: Nucleic acid base sequence:DR4 of array number 44 statement, B1\*0401, B1\*0402, B1\*0403, B1\*0404, B1\*0405, B1\*0406, B1\*0407, B1\*0408 (Obata.), F., Abe A., Ohkubo M. and others, and 27 Hum Immunol 269 pages - 284 page 1990

F7: A nucleic acid base sequence of array-number 45 statement: DR7, B1\*0701, B1\*0702, nucleic acid base sequence:DRw8 of F8:array number 46 statement, JX6, B1\*0801, B1\*0802, B1\*0803, B1-JX6 (Abe.), A., Itol., Ohkubo M. and others, Immunogenetics 30 volume 422 pages - 426 pages 1989

F9:. Nucleic acid base sequence of array number 47 statement :. DR9, B1\*0901F10:. Nucleic acid base sequence of array number 10 statement :. DRw10, B1\*1001F11:. Nucleic acid base sequence of array number 48 statement :. DRw11, B1\*1101, B1\*1102, B1\*1103, B1\*1104F13 : Nucleic acid base sequence:DRw13 of array number 49 statement, DR4-Dw10, B1\*0103, B1\*0402, B1\*1102, B1\*1302F52:. nucleic acid base sequence [ of array number 50 statement ]: -- DRw11, DRw12, DRw13, DRw14, JX6, DR3-Dw3, B3\*0101, B3\*0201, B3\*0202, and B3\*0301 (ObataF., Abe A., Ohkubo M. et al.), 27 Hum Immunol 269 pages - 284 pages 1990

A1416 : A nucleic acid base sequence of array number 11 statement. And a nucleic acid base sequence of K[/or ]1406:array-number 69 statement (F52c: nucleic acid base sequence of array-number 51 statement): DRw14-Dw16, DR3, JX6, DRw13, B1\*0302, B1\*1402, B1-JX6, B3\*0301 (Obata.), F., Itol., Ito K. and others, and 32 Immunogenetics(es) 313 pages - 320 pages 1990  
nucleic acid base sequence [ of F53:array number 52 statement ]: -- DR4,



DR7, and DR9 (Obata F., Abe A., Ohkubo M., Ito I., Kaneko T., Otani F., Watanabe K., Kashiwagi N. et al.), 27 Hum Immunol 269 pages - 284 pages 1990

F120: A nucleic acid base sequence of array-number 53 statement: DRw12a, DRw12b, B1\*1201, and B1-12b (Abe A., Ito I., Ohkubo M. and others, 30 Immunogenetics(es) 422 pages - 426 page 1989),

F121: A nucleic acid base sequence of array-number 54 statement: DRw12a, B1\*0803, B1\*1201 (Abe A., Ito I. and others, Ohkubo M. et al., 30 Immunogenetics(es) 422 pages - 426 page 1989),

F122: A nucleic acid base sequence of array number 55 statement : DRw12b, B1\*0801, B1\*0802, B1\*1101, B1\*1104, B1\*12b, B1-PEV, B1\*1601, B5\*0101, B5\*0102 (Abe A., Ito I., Ohkubo M. and others, 30 Immunogenetics(es) 422 pages - 426 page 1989),

F123: A nucleic acid base sequence of array-number 56 statement: JX6, DR2-Dw22, B1\*1602, B1-JX6 (Obata F., Abe A., Ohkubo M. and others, 27 Hum Immunol 269 pages - 284 page 1990),

F142: A nucleic acid base sequence of array-number 57 statement: DRw14c, B1-14c (Obata F., Ito I., Ito K. and others, 32 Immunogenetics(es) 313 pages - 320 page 1990),

F143: A nucleic acid base sequence of array-number 58 statement: DRw14-Dw9, B1\*1401 (Obata F., Ito I., Ito K. and others, 32 Immunogenetics(es) 313 pages - 320 page 1990),

F22: A nucleic acid base sequence of array-number 59 statement: B5\*0101 (33 Obata F., Ito I., and Kaneko T. Tissue Antigens 550 pages - 558 page 1989),

F29: A nucleic acid base sequence of array-number 60 statement: B1\*0901, B5\*0102, B5\*0201, B5\*0202 (Obata F., Ito I., Kaneko T. et al., 33 Tissue Antigens 550 pages - 558 page 1989),

F30: A nucleic acid base sequence of array-number 12 statement: Nucleic acid base sequence: B1\*0406 of B1\*1103 and F42: array number 61 statement (Obata F., Ito I., Kaneko T. and others, 33 Tissue Antigens 550 pages - 558 page 1989),

F44: Nucleic acid base sequence of array number 13 statement : Nucleic acid base sequence: B1\*0403 of B1\*0401 and F45: array number 14 statement, B1\*0406, B1\*0407, F46 : Nucleic acid base sequence: B1\*0101 of array number 62 statement, B1\*0102, B1\*0404, B1\*0405, B1\*0408, B1\*1402, (Obata F., Ito I., Ito K. and others, 32 Immunogenetics(es) 313 pages - 320 page 1990)

F141: A nucleic acid base sequence of array-number 63 statement: B1\*0701, B1\*0702, B1\*1401, and B1-14c, B3\*0301 (Obata F., Ito I., ItoK. and others, 32 Immunogenetics(es) 313 page-320-page 1990),

F158: A nucleic acid base sequence of array-number 64 statement: B1\*0405, B1\*0801, B1\*0803, B1\*1303 (Obata F., Ito I., Kaneko T. et al., 33 Tissue Antigens 550 pages - 558 page 1989),

F863: A nucleic acid base sequence of array number 15 statement : B1\*0102, B1\*1201, and B1-12b, B5\*0201, B5\*0202, F851:. Nucleic acid base sequence of array number 16 statement :. B1\*0101, B1\*0102, B1\*0103, B1\*0301, B1\*0302, B1\*0401, B1\*0402, B1\*0403, B1\*0404, B1\*0406, B1\*0407, B1\*0408, B1\*0802, B1\*1001, B1\*1301, B1\*1302, B1\*1402, B1-JX6, B1-PEV, B3\*0201, and B3\*0202 — genotype, DR which has become clear, and D phenotype were indicated to Table 1 about a typing result obtained by a probe of these.

[0026]

[Table 1]

## HLA-DRタイピング用オリゴヌクレオチドプローブ

プローブ名	塩基配列	位置	遺伝子型
F1	ATAGATGCATCTTTCCAGC	78-96 (-)	B1*0101, B1*0102, B1*0103
F2	GTGGGGTTCTGTCAGAG	70-88 (+)	B5*0101, B5*0102, B5*0201, B5*0202
F3	GTGGACAACCTACTGCAGAC	223-241 (+)	B1*0301, B1*0302
A3	GCGGGTGGACAAGTACT	218-235 (+)	
F4	TACTTCTATCAGCAAGAGG	89-106 (+)	B1*0401, B1*0402, B1*0403, B1*0404 B1*0405, B1*0406, B1*0407, B1*0408
F7	ATAGAAGAGTCTTTGCCAGG	78-96 (-)	B1*0701, B1*0702
F8	TAGGTGTCCAGCAGGGCC	216-233 (-)	B1*0801, B1*0802, B1*0803, B1*0804
F9	TCTGTGCAGATACCGCAGC	69-87 (-)	B1*0901
F10	TTATGGACGCGTCTTTGCA	80-98 (-)	B1*1001
F11	GCCTGATGAGGAGTACTGG	166-183 (+)	B1*1101, B1*1102, B1*1103, B1*1104
F13	ACATCCTGGAAGACGAGCG	197-215 (+)	B1*0103, B1*0402, B1*1102, B1*1302
F52	TGTCTGCAGTAATTGTCCA	224-242 (-)	B3*0101, B3*0201, B3*0202, B3*0301
F52c	GTTCCTGGAGAGATACTTC	75-93 (+)	B1*0302, B1*1402, B1*0805, B3*0301
A1416	AGCGCACGTTCTCTCCTG	100-118 (-)	
K1406	GCACGTTCTCCTCCTGGTT	103-121 (-)	
F53	GAGTGTGGAAGCTGATCAG		
F120	AGGAGGAGCTCCTGCGCTT	181-119 (+)	B1*1201, B1*12b
F121	GACATCCTGGAAGACAGGC	196-214 (+)	B1*0803, B1*1201
F122	ACTTCCTGGAAGACAGGGC	197-215 (+)	B1*0901, B1*0902, B1*1101, B1*1104, B1*12b B1*PEU, B1*1601, B5*0101, B5*0102
F123	GACCTCCTGGAAGACAGGC	196-214 (+)	B1*1602, B1*0805
F142	AGTACTCAGCATCAGGCCG	163-181 (-)	B1*14c
F143	TGCTGGGGAGCACTGGAAC	168-186 (+)	B1*1401
F22	AGCGCAAGTCTCTCTGTTG	100-118 (-)	B5*0101
F29	TTATAGATGCTCTGTGCA	80-98 (-)	B1*0301, B5*0102, B5*0201, B5*0202
F30	GCTCCTCTTCCAGGAAGTC	196-214 (-)	B1*1103
F42	TATCACCAAGAGGAGTCCGT	94-113 (+)	B1*0406
F44	GAGCAGAAGCGGGCCGCG	205-222 (+)	B1*0401
F45	AGCAGAGGGGGGCCGAGG	206-223 (+)	B1*0403, B1*0406, B1*0407
F46	GCAGAGGCGGGCCGCGGT	207-224 (+)	B1*0101, B1*0102, B1*0404, B1*0405, B1*0406 B1*1402
F141	AGCGCACGAAGTCTCTCCTG	100-118 (-)	B1*0701, B1*0702, B1*1401, B1*14c, B3*0301
F158	GGCTAGCGCGCGAGTACT	164-181 (+)	B1*0405, B1*0801, B1*0803, B1*1303
F863	TACGGGGCTGTGGAGAGC	247-264 (+)	B1*0102, B1*1201, B1*12b, B5*0201, B5*0202
F851	TACTCGGCATCAGGCCGC	162-179 (-)	B1*0101, B1*0102, B1*0103, B1*0301, B1*0302 B1*0401, B1*0402, B1*0403, B1*0404, B1*0406 B1*0407, B1*0408, B1*0802, B1*1001, B1*1301 B1*1302, B1*1402, B1*0805, B1*PEU, B3*0201 B3*0202

位置を示す番号はエクソン部の最初の塩基を1番目として記載した。

(+)はオリゴヌクレオチドプローブがコーディングストランドに対して合成され、(-)は非コーディングストランドに対して合成されていることを示す。

[0027]An oligonucleotide cannot be used for a pair of DRB1 allele to classify between DRB1\*0403-DRB1\*0407, DRB1\*0404-DRB1\*0408, DRB1\*1101-DRB1\*1104, and DRB1\*1301-DRB1\*1302. Since arrangement of these DRB1 domains differs only in amino acid #86 (a glycine or valine) mutually and is shared too much by DRB allele of very many [ arrangement / of this part ], It is because it is impossible to this invention to identify a mold of special DRB with typing by an oligonucleotide of \*\*\*\*\*.

[0028]DRB1\*0701 and DRB1\*0702 have the same DRB1 domain arrangement, and distinguishing is impossible. In this patent, a these DRB1 type pair is indicated as arbitrary independent DR types. DRB1\*0403 and DRB1\*0407 Namely, DRB1\*04 (03/07), DRB1\*0404 and DRB1\*0408 DRB1\*04 (04/08), As for DRB1\*0701 and DRB1\*0702, DR B1\*07 (01/02), DRB1\*1101, and DRB1\*1104 is. DRB1\*11

(01/04), DRB1\*1301, and DRB1\*1302 expresses DRB1\*13 (01/02).

[0029]DRB5 allele, DRB5\*0101, and DRB5\*0102 were chosen as the target of an oligonucleotide at DRB type identification of DRw15 relation. In this case, it is because it is rich in DRB5 raucous \*\* DRB1 raucous twist nearby polymorphism. Wu S., SaundersT.L., BachF.H. et al.. 324 Nature(s) 676 pages - 679 pages 1986 .Lee B.S.M., Rust N.A., McMichael A.J., McDvitt H.O. et al., 84 Proc Natl Acad Sci USA 4591 pages - 4595 pages On the other hand, in the DRB type case of DRw16 relation, it chose as information loci of gene typing of DRB1 and DRB5 1987.

[0030]the strong linkage disequilibrium between these situations and DRB1 special allele, and DRB5 special allele sake (Bodmer J.G., Marsh S.G.E., ParhamP. et al..) 35 Tissue Antigens 1 page - 8 pages 1990 .Wu S., Saunders T.L., BachF.H. et al., 324 Nature(s) 676 pages - 679 pages 1986 .Lee B.S.M., Rust N.A., McMichael A.J., McDvitt H.O. et al., 84 Natl Acad Sci USA 4591 pages - 4595 pages 1987 .Liu C-P, BachF.H., Wu S. et al., J 140 Immunol(s) 3631 pages - 3639 pages 1988 .Knowles R.W., Histocompatibility Testing 1987 New York, Springer-Verlag, 44 pages - 46 pages 1989, Consider DRB1, DRB5 type, or haplotype to be DRB type one [ equivalent to DRB1 type ], and DRB1\*1501-B5\*0101 and DRB1\*1502-B5\*0102, It is expressed as DRB1\*1601-B5\*0201 and DRB1\*1602-B5\*0202. (Table 2)

[0031]

[Table 2]

一つの組み合わせ	他の組み合わせ	検出数
1 B1*x0101	B1*x0102	0
2 B1*x0101	B1*x1601-B5*x0201	0
3 B1*x0102	B1*x1601-B5*x0201	0
4 B1*x0101	B1*x1602-B5*x0202	0
5 B1*x0101	B1*x0402	1
6 B1*x0101	B1*x1201	1
7 B1*x0101	B1-x12b	1
8 B1*x1502-B5*x0102	B1*x1601-B5*x0201	0
9 B1*x1502-B5*x0102	B1*x1601-B5*x0201	0
10 B1*x1502-B5*x0102	B1*x1201	0
11 B1*x0301	B1-x12b	2
12 B1*x0301	B1*x0302	0
13 B1*x0301	B1-x13(01/02)	0
14 B1*x0301	B1*x1402	0
15 B1*x0301	B1-JX6	0
16 B1*x04(03/07)	B1*x0406	0
17 B1*x04(04/08)	B1*x0801	0
18 B1*x11(01/04)	B1*x11(01/04)	3
19 B1*x11(01/04)	B1*x1102	3
20 B1*x11(01/04)	B1*x1103	1
21 B1*x0802	B1*x1303	0
	B1*x0102	0
	B1*x1502-B5*x0102	0
	B1*x1602-B5*x0202	0
	B1*x04(04/08)	0
	B1*x1201	0
	B1-x12b	0
	B1*x1601-B5*x0201	0
	B1*x1602-B5*x0202	0
	B1*x1201	0
	B1-x12b	0
	B1*x0302	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1*x1402	0
	B1-JX6	0
	B1*x0406	0
	B1*x0801	0
	B1*x11(01/04)	0
	B1*x1102	0
	B1*x1103	0
	B1*x0801	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/02)	0
	B1-x1402	0
	B1-JX6	0
	B1-x0406	0
	B1-x0802	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/04)	0
	B1-x12b	0
	B1-x13(01/	

[0032] Since 33 sorts of different DRB types containing the haplotype combined with the four sorts of DRB1-B5 type pair or DRw15, and DRw16 unique

target can identify by our oligonucleotide typing, Two sorts of possible DRB type combination which appears by a sample will be 561 kinds in all. According to computer search, it cannot be distinguished among these whether depending on oligonucleotide typing, it is equivalent to which of two DRB type combination in 28 cases. Among this, a DRB type judgment in seven cases, DRB1 allele of DRw11, DRw12, DRw13, DRw14, DRw17, and DRw52 family that consists of DRw18 always links to four sorts of DRB3 allele (\*0101, \*0201, \*0202, and \*0301) (Bodmer.). J. G., Marsh S.G.E., Parham P. and others, and 35 Tissue Antigens 1 page - 8 pages 1990 .Abe A., Ito I., Ohkubo M. et al., Immunogenetics 30 volume 422 pages - 426 pages 1989 .Obata F. Abe A. Ohkubo M. et al., 27 Hum Immunol 269 pages - 284 page 1990 .Petersdorf E.W., Griffith R.L., Erlich H.A. et al., Immunogenetics 32 volume 96 pages - 103 pages 1990 .Obata F., Ito I., Ito K. et al., and 32 Immunogenetics(es) 313 pages - 320 page 1990 .Knowles R.W., Dupont B. et al., Histocompatibility Testing 1987 .New York, Springer-Verlag, 44 pages - 6 pages 1989 .Tiercy J-M, Gorski J., Jeannet M., Mach B. et al., Proc Natl Acad Sci USA 85 volume 198 pages - 202 pages 1988 .Fernandez-Vina M., Shumway W., Stastny P. et al., 28 Hum Immunol 51 pages - 64 pages Since these [ all ] will be detected by F52 which is a kind of oligonucleotide currently made to the fixed arrangement of DRB3 allele in 1990, typing becomes possible.

[0033]As a result, 21 cases shown in Table 2 are left behind as identification being impossible with our oligonucleotide typing. The oligonucleotide probe group proposed in a detection target substance book patent is equivalent to a part of DNA sequence which forms the membrane protein currently expressed by cell surface. Therefore, of course, it is effective also to messenger RNA and C-DNA to make a chromosomal DNA applicable to detection. A known method is used for extraction of these three kinds of nucleic acid. Any are chosen in for [ these ] detection changes with the environment where an inspection is conducted.

[0034]Sample DNA used in this invention can be extracted from human various portions. As the example, hair, such as hair of peripheral blood, the tunica mucosa oris, and hair, and a hair root, a nail, etc. can be mentioned. When extracting a chromosomal DNA from peripheral blood, the tunica mucosa oris, hair, and a hair root among these, they are used by potassium chloride, a magnesium chloride, gelatin, a surface-active agent, and trischloride

buffer solution containing the protease K, being fond. When extracting a chromosomal DNA from a nail, sodium chloride, EDTA, sodium dodecyl sulfate, dithiothreitol, and the trischloride buffer solution containing the protease K are fond, and are used. Although sodium dodecyl sulfate of ionicity, nonionic Tween 20, or NONIDETO P40 can be mentioned as an example of a surface-active agent in this solution, it is especially used by Tween 20, being fond. After heat-treating at the temperature of 37 \*\* - 60 \*\* for 0.1 hour - 1 hour and heat-treating for [ 1 minute - ] 10 minutes at the temperature of not less than 90 more \*\* after that by using this solution, it can ice-cool and the solution of a chromosomal DNA can be obtained through phenol extraction and chloroform washing. DNA obtained by this operation can be used for hybridization as it is, when there are many the amounts of chromosomal DNAs.

[0035]When there is little the quantity if needed, after especially the above-mentioned nucleic acid used for this invention amplifies a specific region, covering it over PCR (polymerase chain reaction), it can be used for hybridization. In this case, since the amount of samples increases, there is an advantage that detection becomes easy. In hanging the specific region of a chromosomal DNA on PCR, after only centrifuging, without performing phenol extraction under above-mentioned operation and after heat-treatment, and chloroform washing, using the digestive liquor is also performed.

[0036]In order to apply the method of PCRPCR to DRB type typing, the general method of amplifying all the all the possible DRB(s) type genes by a single step using one set of primer and the group specific amplifying method which amplifies only the DRB gene of a kind of DRB type or kind can be considered.

[0037]the group specific-among these two methods amplifying method -- a group, although it is the specific amplifying method therefore. In order to perform group specific amplification by that it is required to identify a target DRB type first and a single step, there is a problem that it must amplify in the separated individual tube using all the possible primers. Whether the group specific amplifying method is adopted or the general amplifying method is adopted have started how precise gene typing is required. That is, the group specific amplifying method is useful although all the DRB types known are identified, and on the other hand, the general amplifying method is useful at the point that it is dependent on selection

of a probe and may be typed at a stretch about many samples. Therefore, for typing of the DRB type which is the purpose of this patent, a mainly general method is used among these methods.

[0038] It cannot be overemphasized that it is useful also when the oligonucleotide probe group which this patent provides types using the group specific amplifying method.

The base sequence of the oligonucleotide primer used for PCR suitably used in oligonucleotide primer this invention for PCR is as follows.

nucleic acid base sequence [ of FPR1:array number 65 statement ]: (Obata F., Ito I., Kaneko T., Ohkubo M., Ishimoto A.L., Abe A., Kashiwagi N. et al.) 33 Tissue Antigens 550 - 558 pages 1989

GH46: Nucleic acid base sequence of array number 67 statement : (Scharf S.J., Long C.M., Erlich H.A. and others, 22 Hum Immunol 61 -69-page 1988)

DRbetaAMP1: Nucleic acid base sequence of array number 66 statement : (Todd J.A., Bell J.I., McDevitt H.O. and others, 329 Nature(s) 599 -604-page 1987)

Among these An oligonucleotide primer, According to the combination of FPR1-DRbetaAMP1, the 2nd and 3rd hypervariable regions (238bp) of the 2nd exon part of a DRB gene can be amplified (Kaneko Obata F., Abe A., Ohkubo M., Ito I.). T., Otani F., Watanabe K., Kashiwagi N. et al., and 27 Hum Immunol 269 - 284 pages It will be the most desirable at that [ 1990 ].

[0039] If the condition oligonucleotide probe of an amplification reaction is used in a film, a grain, and the state where it fixed to the tabular substance and the hybridization reaction in a heterogeneous system is performed, when performing this amplification reaction, It is embellished so that the sign of this oligonucleotide primer may be carried out or a sign may be carried out by this substance by the substance which can cause one phenomenon of radioisotope and/or fluorescence, coloring, and luminescence, And/or, it faces performing the DNA amplification reaction of a sample gene using an oligonucleotide primer, It is required to use the nucleic acid which the sign is carried out by the substance of the reaction which can cause one phenomenon of radioisotope and/or fluorescence, coloring, and luminescence in part at least, or is embellished so that a sign may be carried out with this substance.

[0040] On the other hand, if hybridization is carried out using the oligonucleotide probe which carried out the sign after fixing sample DNA to a film, a grain, and a cylindrical substance, It is unnecessary to carry



out the sign of the sample DNA in an amplification reaction, and the sign was carried out or it becomes unnecessary to use the reactional substrate embellished in the state in which a sign is possible. It is preferred to make it react in tris and chloride buffer solution which uses heat-resistant DNA polymerase for an enzyme in order to cause the above-mentioned amplification reaction smoothly, and contains potassium chloride, a magnesium chloride, gelatin, dGTP, dCTP, dTTP, dATP, and an oligonucleotide primer. It is required to carry out the sign of the DNA which will serve as a sample if hybridization is carried out using the film etc. which fixed the oligonucleotide probe, The method of adding the oligonucleotide primer embellished with inactive substances, such as nucleic acid, such as dATP, dUTP, etc. which were embellished with inactive substances, such as nucleic acid containing radioisotope or biotinylation, radioisotope, or biotinylation, will be adopted. In this, using radioisotope, the method of using the substance embellished with inactive substances, such as biotinylation, is fond on the safety measures of an inspection, and is used [ rather than ]. In the biotinylated nucleic acid, in order to make hybridization perform smoothly, biotinylation-14-dATP is fond and is used. For example, when biotinylation-21-dUTP is used instead of biotinylation-14-dATP, dispersion may be accepted in hybridization intensity.

[0041] In this case, although it changes with the quantity of the organization which becomes a sample, quantity of blood, etc., an PCR reaction is performed by repeating the cycle of 20 temperature falls or more and temperature up, and in order to conduct the continuing inspection smoothly, it is preferred [ sample DNA / being amplified by the about 1microg grade ]. When there are few amounts of samples, after performing 30 times of PCR, it is also effective to add an enzyme to the reaction mixture and to carry out by repeating PCR further.

[0042] In specifically using the DNA solution extracted from hair, such as hair of hair, The 1st reaction is first heated for 3 minutes at 94 \*\*, 58 \*\* performs for 2 minutes at 72 \*\* for 2 minutes succeedingly, and, as for PCR of the 2nd henceforth, it is preferred to carry out on the conditions which the last says for 2 minutes for 1 minute at 58 \*\* for 1 minute, and says for 2 minutes at 72 \*\* at 72 \*\* by 94 \*\*. In using the DNA solution extracted from about 30,000 tunica-mucosa-oris cells, The 1st reaction is

first heated for 3 minutes at 94 \*\*, 58 \*\* performs for 2 minutes at 72 \*\* for 2 minutes succeeding, and, as for PCR of the 2nd henceforth, it is preferred to carry out on the conditions which the last says for 1 minute for 30 seconds at 58 \*\* for 10 seconds, and says for 2 minutes at 72 \*\* at 72 \*\* by 94 \*\*.

[0043]The using form oligonucleotide probe of an oligonucleotide probe combines this probe with a suitable substrate chemically, It is possible to use it in which gestalt of whether it fixes to this substrate or for it to be made to adsorb physically and to fix or the state where it was dissolved or suspended in the solution, and it is very good in which these gestalten. However, in order to use the oligonucleotide probe of a large excessive amount generally at the time of hybridization, In carrying out hybridization of the oligonucleotide probe by the state or suspended state voice dissolved into the solution, Usually, since an uncrossed oligonucleotide probe must be removed and the existence of hybridization must be detected, The method of fixing to substrates, such as a film for nucleic acid immobilization, beforehand, and carrying out hybridization of the fragment of a gene or a gene used as a sample using this substrate, Or the method of carrying out hybridization using the liquid which fixes the oligonucleotide probe conversely, and dissolved or \*\*\*\*(ed) sample DNA or its fragment, It adds to this oligonucleotide probe as a strange method of the latter method, One kind of oligonucleotide probe equivalent to the base sequence of portions other than the DNA sequence equivalent to this oligonucleotide probe in a sample which will be rubbed if small is used, Fix this probe to the film for nucleic acid immobilization, and specific arrangement is connected with the three-dash terminal or five prime end of the method and the oligonucleotide which performs hybridization, The method of fixing arrangement complementary to this base sequence to these substrates for immobilization, such as a film, beforehand, and performing hybridization, etc. are adopted.

[0044]In these methods, it is used by the method of using it in the shape which is in the state which combined this probe chemically, or was fixed in the state of any in the state where it adsorbed physically, being fond so that sample DNA and a hybridization reaction can be more easily performed for an oligonucleotide probe in an uneven phase. In this method, it cannot be overemphasized that it is preferred to use it in the state where it joined

together chemically in the form which does not have trouble in a hybridization reaction. under the present circumstances -- as a substance which is alike and combines a probe, there are a film-like substance, a granular substance, and a tabular substance -- or [ these any ] -- from -- it will be chosen. In order to make the operativity of hybridization reaction time good, in these, the shape of a film or a tabular substance is fond, and is used, and especially, a film-like substance is most fond and is used.

[0045] In order to make fixed quantity increase, and in order to control inhibition of the hybridization reaction on this substrate in order to fix a probe to these substances, before fixing, the tailing is generally carried out by the homopolymer of nucleic acid, and it is preferred to fix this probe that carried out the tailing. For that purpose, generally the tailing processing of the three-dash terminal of a probe which performs terminal deoxynucleotidyl transferase to an enzyme as a reactional substrate using dTTP, dATP, dCTP, or dGTP is adopted.

[0046] In this processing, the trischloride buffer solution containing sodium cacodylate, a cobalt chloride, dithiothreitol, dTTP, dATP, dCTP or dGTP, and a probe is used. In this case, poly dT which uses dTTP for a reactional substrate as a homopolymer is fond, and is formed, and, as for more than 200 base length, 2000 or less base of that length is more preferably formed [ more than 50 base length / more than 100 base length ] by the base length of 500 or less base 1000 or less base.

[0047] Thus, by the heating method, the UV irradiation method, or other methods, the oligonucleotide probe which is obtained and which carried out the tailing makes a chemical bond form in the film which contains cellulose or nylon as an ingredient, and is fixed to it. As an example of these films, Hybond<sup>TM</sup>-C, Hybond<sup>TM</sup>-C extra, Hybond<sup>TM</sup> -ECL, Hybond<sup>TM</sup>-N, and Hybond<sup>TM</sup>-N+ (Amersham), Although Whatman541filter (Whatman), Duralon<sup>TM</sup>UV, Duralose-UV<sup>TM</sup> (Stratagene), PhotoGene Nylon Membrane (BRL), etc. can be mentioned, It will not interfere, if a gene or an oligonucleotide probe may be combined even if it uses except [ these ]. When a gene or an oligonucleotide probe is fixed to these films, it is based on methods, such as heat-treatment or UV irradiation processing, but about whether it is based on this either or option, it will change suitably with the character of the film to be used. For example, in using Duralon UV and Hybond-N+,

it fixes by a UV irradiation method, and when using Hybond-C extra, the method of heating at 80 °C among a vacuum is found, and is adopted.

[0048] On the other hand, in order to fix a sample gene, heat-treatment or the method of carrying out UV irradiation is adopted as it is in sample DNA. It may be preferred to embellish a five prime end or a three-dash terminal with poly dT etc. to parts other than the base sequence which is needed for detection, for example, and embellishing a sample gene in these cases is also performed. As a method for these, there is an elongation reaction using the oligonucleotide and ligase which have a base sequence required for the elongation reaction or ornamentation by nucleic acid and a terminal deoxy NUKUREOCHIDIRU transferase in ornamentation of a three-dash terminal. The method of combining the beforehand suitable base sequence for the five prime end portion of the primer used for PCR, etc. are adopted as ornamentation of a five prime end.

[0049] In order to investigate the existence of hybridization, change with methods of hybridization, but. It is carried out by detecting this marker by carrying out the sign of an oligonucleotide probe or the sample DNA by the substance which can cause one phenomenon of radioisotope and/or fluorescence, coloring, and luminescence, or embellishing so that a sign may be carried out with this substance.

[0050] As a marker used here, \*\*\*\* radioisotope, such as radioisotope like <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, and <sup>125</sup>I, a fluorochrome like fluorescein isothio SHINETO (FITC) or biotin, and digoxigenin, can be mentioned. In detection, publicly known methods, such as making an X-ray film expose radioisotope etc., In the case of a fluorescent substance, measurement by a fluorophotometer causes a luminous phenomenon or a coloration phenomenon with biotin, the enzyme which was respectively combined with streptoavidin or an anti-JIKOGISHI genin antibody in the case of the digoxigenin, etc., The method of measuring these with a photometer and the method which an X-ray film is made to expose are adopted. Alkaline phosphatase and Japanese horseradish peroxidase can be mentioned as an enzyme used here.

[0051] These markers can also be added [ also inserting into these base sequences, and ] to a five prime end part or a three-dash terminal part by using the nucleic acid which performed ornamentation suitable for these purposes at composition of an oligonucleotide or the time of preparation of a sample gene, or amplification. Thus, each of obtained labeling

oligonucleotides or labeling sample genes are applicable to typing of HLA-DR.

[0052] In hybridization this invention, it recommends performing the DNA fragment which amplified hybridization from the quality of a filmy material which fixed a required kind of probe, a particulate matter or the quality of a board-shaped object, and a sample using sample DNA which carried out alkaline denaturation. For this hybridization reaction, 3M tetramethylammonium chloride, 2mM EDTA, 5x Denhardt's solution, 0.1 % of the weight SDS (sodium dodecyl sulfonate) and also 50mM containing the denatured DNA of 100 microg/ml concentration Trischloride buffer solution (pH 8.0) is fond, and is used. However, to say nothing of the liquid of other presentations being used, as the example, 6xSSC (0.9M sodium chloride, 0.09M sodium acid citrate), 0.5%SDS, the liquid containing the denatured DNA of 100 microg/ml concentration, etc. are mentioned.

[0053] Hybridization is performed at the temperature of 42 \*\* in the above-mentioned solution for 30 minutes thru/or 10 hours. After hybridization the film which fixed the probe and was usually applied to hybridization Under a room temperature, the inside of the washing solution whose presentations are 6xSSC and 0.1% SDS -- the temperature of every [ a for / 5 minutes ] 2 times thru/or, 40 \*\* which it washes 5 times and is the temperature at the time of hybridization succeedingly thru/or 65 \*\* -- 5 minutes -- or it washes for 30 minutes. Then, it washes under a 1-time room temperature in a 2xSSC solution. A presentation can also use the solution of 2xSSPE (0.3M sodium chloride and 0.02M phosphoric acid 1 sodium, 2mM EDTA) and 0.1%SDS, or a tetramethylammonium chloride solution for a penetrant remover here 6xSSC and instead of being a solution of SDS 0.1%.

[0054] As described above, in this invention, recommend performing the DNA fragment which amplified hybridization from the quality of a filmy material which fixed a required kind of oligonucleotide probe, a particulate matter or the quality of a board-shaped object, and a sample using sample DNA which carried out alkaline denaturation, but. It is also possible to perform the DNA fragment amplified from the sample using the oligonucleotide probe which dissolved into the quality of a filmy material fixed by the aforementioned method, a particulate matter or the quality of a board-shaped object, and a solution.

[0055] Hybridization at this time is performed as follows, for example.

First, a film is cut off to 12 pieces, as a piece has one dot, First each piece with 12 sorts of oligonucleotide probes (F1, F2, F4, F7, F8, F9, F11, F120, F13, F123, F142, F143, two ng(s) each/ml) which carried out  $^{32}\text{P}$  label 6xSSC (sodium chloride, sodium acid citrate), 0.5%SDS, Among the mixed liquor of 5x DENHARUTO liquid, at 37 \*\*, it is made to hybridize for 2 to 3 hours, and a film is washed on condition of the following. The result which receives these oligonucleotide probes first here is investigated. [0056]After this result is obtained, a film is processed at 37 \*\* for 15 minutes among 0.4MNaOH, then, 0.1xSSC (15mM sodium chloride and 1.9mM sodium acid citrate.) Among the solution which consists of pH7.0 0.01%SDS, process at 37 \*\* for 15 more minutes, and an oligonucleotide probe is removed, It is made to hybridize by 14 sorts of other different oligonucleotide probes (F3, F10, F22, F29, F42, F44, F45, F46, F121, F122, F158, F52c, A1416, K1406), and the above-mentioned method. In addition to the above-mentioned oligonucleotide probe, F30, F52, F141, F851, and F863 are used for what cannot be thoroughly decided in the above-mentioned hybridization.

[0057]The washing solution presentation after hybridization and the washing temperature are as follows.

F1, F2, F7, F9, F29, F143, and F158:6xSSC (sodium chloride.) Sodium acid citrate, 0.1%SDS, 54 \*\* F4, F8, F10, F22, F52, F52c, A1416, K1406, F121, F851, and F863:6xSSC (sodium chloride.) sodium acid citrate, 0.1%SDS, 57 \*\* F11, F13, F30, F42, F120, F122, F123, F141, and F142:6xSSC: (sodium chloride.) Sodium acid citrate, 0.1%SDS, 62 \*\*: F45, F46:3M tetramethylammonium chloride, 57 \*\*: In all the cases of F3 and F44:3M tetramethylammonium chloride and the 62 \*\* above-mentioned washing, it has a penetrant remover, be in them, and wash for 5 minutes under a room temperature to them, before washing a membranous fragment at the above-mentioned temperature.

[0058]It is necessary to carry out hybridization in this case with an individual container for every oligonucleotide probe which you are going to make it hybridize, It cannot be overemphasized that the quality of a filmy material, the particulate matter, or the quality of a board-shaped object which fixed a number of an oligonucleotide probe of the reaction vessels and sample DNAs to be used must be used, therefore that an inspection implementation person's operation becomes complicated.

[0059]The example as a result of the hybridization obtained by such

operation was shown in drawing 2, drawing 3, and drawing 4.

DRB gene typing of 375 healthy Japanese whose D types serological DR type or cytological are unknown was performed using the oligonucleotide probe and oligonucleotide primer of the inspection result above.

[0060] This patent has theoretically a case which cannot identify 21 sorts also by the oligonucleotide probe group of a statement as already described. However, 15 cases are DRB types rarely seen in Japanese people among the cases which cannot identify [ these ] 21 sorts, For example, DRB1\*0102, DRB1\*0103, DRB1\*0301, DRB1\*0302, DRB-PEV and DRB1\*1601, and DRB5\*0201 were not accepted by 375 Japanese who investigated this time. Therefore, six cases [ 11 ] (cases 5, 6, 9, 16, 17, and 18) cannot be identified eventually. That is, 364 persons' (97%) mold judging is able to be performed among 375 persons.

[0061] Comparison with the gene frequency which was able to obtain again comparison with the gene frequency which was able to obtain the gene frequency obtained from the above-mentioned result from serological typing in Table 4 from cytological typing in Table 5 was shown in Table 3. It is distinct that the blank value which shows the mold which cannot belong by the typing method which uses the probe group provided by this patent and this probe group rather than based on the conventional typing method becomes small, and mold division accuracy is improving from this value.

[0062]

[Table 3]

## 日本人でのDRB型の遺伝子頻度

DRB型	HLA特異性		検出された 人数	遺伝子頻度
DR	D			
B1*0101	DR1	Dw1	46 (+2)	0.66
B1*0102	DR1	Dw20	0	0
B1*0103	DR' BR'	Dw' BON'	0	0
B1*1501-B5*0101	DRw15	Dw2	50	0.069
B1*1502-B5*0102	DRw15	Dw12	66 (+2)	0.095
B1*1601-B5*0201	DRw16	Dw21	0	0
B1*1602-B1*0202	DRw16	Dw22	5	0.007
B1*0301	DRw17	Dw3	2	0.003
B1*0302	DRw18	Dw' RSH'	0	0
B1*0401	DR4	Dw4	8	0.011
B1*0402	DR4	Dw10	0	0
B1*04(03/07)	DR4	Dw13	27 (1.5)	0.039
B1*04(04/08)	DR4	Dw14	2	0.003
B1*0405	DR4	Dw15	89 (+3)	0.131
B1*0406	DR4	D' KT2'	27 (+3)	0.041
B1*11(01/04)	DRw11	Dw5/Dw' FS'	22 (+1)	0.031
B1*1102	DRw11	Dw' JVM'	0	0
B1*1103	DRw11	Dw' new'	0	0
B1*1201	DRw12	Dw' DB6'	29	0.039
B1-12b	DRw12		9	0.012
B1*13(01/02)	DRw13	Dw18/Dw19	64	0.089
B1*1303	DR' 6V'	Dw' HAG'	0	0
B1-PEV	DR' 6V'	Dw' PEV'	0	0
B1-JX6	-	-	17	0.023
B1*1401	DRw14	Dw9	29	0.039
B1*1402	DRw14	Dw16	12	0.016
B1-14c	DRw14	-	12	0.016
B1*07(01/02)	DR7	Dw17/Dw' DB1'	3	0.004
B1*0801	DRw8	Dw8.1	0	0
B1*0802	DRw8	Dw8.2	28 (+3)	0.042
B1*0803	DRw8	Dw8.3	54	0.075
B1*0901	DR9	Dw23	99	0.142
B1*1001	DRw10	-	5	0.007
ブランク			-	0.0005

( ) : 遺伝子型分けにおいてDRBアレルで二通りの形式があるもの  
 ブランク : 1-遺伝子頻度の合計値

[0063]

[Table 4]



血清学的ワークショップでの遺伝子頻度とプローブでの遺伝子頻度の比較

DR特異性	プローブ型分け n=375	9回IHW n=514	3回AOHW n=472
DR1	0.066	0.062	0.064
DR2 (w15+w16)	0.172	0.155	0.189
DR3 (w17+w18)	0.003	0.006	0
DR4	0.217	0.243	0.236
DRw11	0.031	0.023	0.031
DRw12	0.052	0.061	0.039
DRw13	0.089	0.039	0.032
DRw14	0.072	0.079	0.028
DR7	0.004	0	0.004
DRw8	0.115	0.091	0.133
DR9	0.142	0.127	0.141
DRw10	0.007	0.002	0.004
DRJX6	0.023	-	-
ブランク	0.007	0.113	0.100

[0064]

[Table 5]

MLRワークショップでの遺伝子頻度とプローブ法での遺伝子頻度の比較

特異性		プローブ型分け n=375	MLR型分け 3回AOHW n=149-159
DR	D		
DR1	Dw1	0.066	0.075
DR2	Dw2	0.069	0.079
	Dw12	0.095	0.096
DR3	Dw3	0.003	0.014
DR4	Dw4	0.011	0.016
	Dw10	0	0.013
	Dw13	0.039	0.006
	Dw14	0.003	0.013
	Dw15	0.131	0.092
	Dw' KT2'	0.041	0.026
DRw11	Dw5/Dw' FS'	0.031	0.023
DRw13	DW18/Dw19	0.089	0.055
DRw14	Dw9	0.039	0
	DW16	0.016	0.014
DR7	Dw11	0.004	0
DRw8	Dw8.1	0	0.003
	Dw8.3	0.075	0.076
DR9	Dw23	0.142	0.056
ブランク			0.328

[0065] As the inspection reagent kit carried out the contents above, in order to obtain a good result in typing using the oligonucleotide probe of HLA-DR, The quality of a filmy material which fixed this probe or this probe, a particulate matter, or the quality of a board-shaped object is

indispensable, and it is desirable to include the hybridization reaction further performed using this probe, a reagent required in order to wash further, and also the reagent which extracts DNA from a sample. In order to carry out this typing smoothly, it is desirable to contain the oligonucleotide primer used for PCR.

[0066]Therefore, it is desirable to contain the reagents and instruments which are needed for an inspection in the reagent kit with which this typing is presented, The film which carried out fixed processing of the oligonucleotide probe group or the oligonucleotide probe group which carried out tailing processing which specifically carried out tailing processing of an oligonucleotide probe group or these, A grain, a board, the reagent for signs, the reagent for the gene amplification reaction of sample DNA, the reagent for hybridization, The reagent for washing performed after hybridization, the object for hybridization operation, and the instrument for washing operation, It comprises some other articles, the standard reagent of the positive control for judging the existence of hybridization and negative control, the example of expression of a decision result, and instruments required for each operation of an inspection being contained, and using these all or oligonucleotide probes as indispensable.

[0067]As a reagent for signs, PhotoGene™ Nucleic Acid Detection System (BRL, Life Technologies Inc.), Southern Light Kit (Boehringer Mannheim) or DIG system™ (Boehringer Mannheim) can be mentioned as an example. As an instrument, plastic tubes, such as a BIO-BIK sampling tube (BioPlastic Co, Ltd.), Test tubes, such as a glass test tube (Corning GlassWorks) which carried out borosilicate processing, Capacity variable digital type pipettes, such as Pipetman™ (Gilson), and the chip for them, The photometer, the X-ray film, the cassette for exposure, the film hanger (Fuji medical system) and thermostat, and water bath tub which detect the plastic bags (made by Cosmobio etc.) in which heat sealing is possible, luminescence produced at the time of an inspection, fluorescence, and a color can be mentioned.

[0068]As for various kinds of reagents, it is common to be provided as a solution thicker than operating concentration so that concentration can be controlled if needed, but even if it prepares to the required concentration at the time of an inspection, it does not interfere.

[0069]

[Effect of the Invention]The oligonucleotide probe group provided by this invention can carry out the mold division of the genotype of the gene which encodes an HLA-DR antigen clearly, and made conventionally possible the mold division of the genotype which was impossible for the mold division by using this oligonucleotide probe. In the case of Japanese people, by using a publicly known oligonucleotide probe collectively, the mold division of the genotype of an HLA-DR antigen was made possible at the 97% and high rate. Thus, according to the method of the genotype division which uses the oligonucleotide probe and it which are provided by this invention, a highly precise mold part injury is attained rather than based on the conventional mold division. In order for typing especially by antiserum to judge including the mold of impossible DR, use of the oligonucleotide probe of this invention is indispensable requirements.

[0070]As mentioned above, progress of research on development of a still newer modality or other medicine is also expectable by the method of the genotype division which uses the oligonucleotide probe and it which are provided by this invention.

[0071]

[Example]Hereafter, an example explains this invention concretely. However, these examples do not limit the technical scope of this invention.

[0072]

[Work example 1]

The synthetic oligonucleotide of the oligonucleotide was compounded using the automatic DNA synthesis machine made from Applied Biosystem (Foster City), and denaturation polyacrylamide gel electrophoresis refined it.

[0073]The base sequence of a PCR primer is the two already reported following kinds.

The following parts use the already reported arrangement FPR1, DRbetaAMP1, and among oligonucleotide probes.

F22, F29, F42, F158F8, F120, F121, F122F2, F4, F123, F52F46, F52c, F141, F142, and an oligonucleotide probe besides F143 were compounded according to the already reported base sequence of DRB allele.

[0074]

[Work example 2]

the Homo sapiens cancellation blood or the tunica mucosa oris (about 28000 cells are included) of extraction-115microl of a chromosomal DNA from a

sample -- TE buffer solution (10mM trischloride (pH 7.4).) of 500microl  
It \*\*\*\*(ed) to 1mMEDTA and centrifuged at 13000 rpm for 10 seconds using  
the desk centrifuge by Eppendorf. Digestive liquor was removed after  
centrifugal separation and it left solid matter. Add TE buffer solution  
of 500microl here, stirred, solid matter was made to \*\*\*\*, and it  
centrifuged again. Digestive liquor was removed after centrifugal  
separation and it left solid matter. Succeedingly, perform this operation  
twice and to the obtained solid matter 50mM potassium chloride, 10mM  
trischloride (pH 8.3), a 1.5mM magnesium chloride, Make solution 100mul  
which consists of 0.001% gelatin, 0.05% Tween 20, and the 10microg protease  
K add and \*\*\*\*, and it was made to react at 56 \*\* for 45 minutes, and after  
heat-treating under boil conditions for 5 more minutes, it quenched in the  
ice bath. Then, the digestive liquor which centrifuges like the point and  
contains a chromosomal DNA was obtained. Besides, 5microl was taken from  
cleaning liquid, and PCR was presented as a chromosomal DNA solution.

[0075]

[Work example 3]

The extraction-210mM trischloride of the chromosomal DNA from a sample (pH  
7.4), To solution 100mul which consists of 100mM sodium chloride and 1mMEDTA,  
1.5 mg of dithiothreitol, 10%SDS25microl -- in addition, make a human nail  
\*\*\*\*, and also add solution 10mul containing 100 mg of protease K, and it  
was made to react at 56 \*\* for 5 minutes - 45 minutes, and after heat-treating  
for 10 minutes at 95 more \*\*, it quenched in the ice bath. Then, the digestive  
liquor which centrifuges similarly in Example 1 and contains a chromosomal  
DNA was obtained. Besides, it 5microl Took from cleaning liquid, and PCR  
was presented as a chromosomal DNA solution.

[0076] [Comparative example 1] Digestive liquor was removed, after  
\*\*\*\*(ing) blood of 50microl to 5%EDTA solution 50mul and centrifuging  
similarly in Example 1 for 5 seconds. Water 200mul was added to the remaining  
solid matter, and it dissolved in it, and heat-treated under boil conditions  
for 5 minutes. The obtained solution was centrifuged like the above and  
digestive liquor was extracted. Besides, 40microl was taken from cleaning  
liquid, and PCR was presented as a chromosomal DNA solution.

[0077] [Comparative example 2] Homo sapiens blood of 50microl was \*\*\*\*(ed)  
to 5%EDTA solution 50mul, and the receipts and payments to a glass syringe  
were performed for this \*\*\*\*\* for 5 minutes using the glass syringe and

the hypodermic needle (22 gauges). Then, it heat-treated under boil conditions for 5 minutes. The obtained solution was centrifuged like Example 1 and digestive liquor was extracted. Besides, 40microl was taken from cleaning liquid, and PCR was presented as a chromosomal DNA solution. [0078] [Comparative example 3] After \*\*\*\*(ing) blood of 100microl in the solution which consists of water 100mul and 5%EDTA50microl and centrifuging similarly in Example 1, the remaining solid matter was \*\*\*\*(ed) to solution 200mul of 0.05% of NONIDETO P40, and was heat-treated under boil conditions for 5 minutes. The obtained solution was centrifuged like the above and digestive liquor was extracted. Besides, 40microl was taken from cleaning liquid, and PCR was presented as a chromosomal DNA solution.

[0079]

[Work example 4] the biotinylation 10xPCR buffer solution (200mM trischloride.) by the polymerase chain reaction (PCR) which uses biotinylation-21-dUTP 15mMMgCl, 250mMKCl, 0.5%Tween20, and 100microg/mlBSA 5microl, Respectively 5mMdATP, 2.5mMdCTP, and 2.5mMdGTP 2.1microl, 1microl and 0.5mM biotinylation-21-dUTP for 5mMdTTP 1.1. 25microl, the DNA solution which obtained 10microM primer liquid (equivalent mixed solution of FPR1 primer and DRbetaAMP1 primer) in 1microl and Example 2 -- 5microl -- water was mixed further and full capacity was set to 49microl. This liquid was mixed, it heated for 5 minutes at 95 \*\*, and neglect cooling was carried out at the room temperature. After adding and stirring Taq.DNA polymerase solution 1mu[ of 2.5 unit / mul ] 1 in this liquid, the mineral oil of 40microl was stratified. Product PCmade from ASTEC-500 was used for this liquid, and PCR was performed 30 times. [0080] The first reactions in PCR were the conditions for 3 minutes at 72 \*\* for 2 minutes in 55 \*\*, and 29 times is the conditions for 2 minutes at 72 \*\* for 1 minute in 50 seconds and 55 \*\* at 94 \*\*, and performed the 30th time on condition of for [ 72 \*\* ] 3 minutes 2nd henceforth. Reaction mixture was 50microl Taken, and after carrying out 165microl mixing of 5microl and the ethanol there and stirring glycogen (10mg/mul) 1microl and 3M sodium acetate (pH 5.5) to it, it cooled for 30 minutes at -20 \*\*. Centrifugality was carried out on 12000-rpm conditions for 5 minutes after cooling, and solid settlings were obtained. Ethanol was added to the obtained settlings 70%, solid settlings were washed, and it dried under decompression after that. Thus, the solid which consists of a DNA by which

obtained U was biotinylated was dissolved in the water of 108microl, and DNA concentration prepared the solution of 0. 01micro g/mu l. The length of generation DNA by PCR checked having applied DNA solution 8mul to 1. 0% agarose gel.

[0081][Comparative example 4] It was operated like Example 4 except having used the DNA solution obtained in the comparative example 1 instead of the DNA solution obtained in Example 2 in Example 4. As a result, in agarose gel, a clear band was not accepted but the DNA solution obtained in the comparative example 1 became clear [ that it cannot be used ].

[0082][Comparative example 5] It was operated like Example 4 except having used the DNA solution obtained in the comparative example 2 instead of the DNA solution obtained in Example 2 in Example 4. As a result, in agarose gel, a clear band was not accepted but the DNA solution obtained in the comparative example 1 became clear [ that it cannot be used ].

[0083][Comparative example 6] It was operated like Example 4 except having used the DNA solution obtained in the comparative example 3 instead of the DNA solution obtained in Example 2 in Example 4. As a result, in agarose gel, a clear band was not accepted but the DNA solution obtained in the comparative example 1 became clear [ that it cannot be used ].

[0084]

[Work example 5]

The biotinylation capacity by PCR which uses biotinylation-14-dATP 50microl, Further the DNA solution obtained in Example 2 including 5microl Potassium chloride, Trischloride buffer solution (pH 8.3), a magnesium chloride, gelatin, dGTP, dCTP, dTTP, dATP, biotin 14-dATP, a primer, The solution which set respectively concentration of vent DNA polymerase (made by NEB) to 50microM, 50microM, 50microM, 30microM, 12microM, 20microM, and 0.02 u/mu l 50mM, 10mM, 1.5mM, and 0.001% was prepared. This solution was heated for 5 minutes at 95 \*\*, and neglect cooling was carried out at the room temperature. After adding and stirring Taq.DNA polymerase solution 1mu[ of 2. 5 unit / mul ] l in this liquid, the mineral oil of 40microl was stratified. Product PCmade from ASTEC-500 was used for this liquid, and PCR was performed 30 times.

[0085]The first reactions in PCR were the conditions for 3 minutes at 72 \*\* for 2 minutes in 55 \*\*, and 29 times is the conditions for 2 minutes at 72 \*\* for 1 minute in 50 seconds and 55 \*\* at 94 \*\*, and performed the

30th time on condition of for [ 72 \*\* ] 3 minutes 2nd henceforth. Reaction mixture was 50microl Taken, and after carrying out 165microl mixing of 5microl and the ethanol there and stirring glycogen (10mg/mul) 1microl and 3M sodium acetate (pH 5.5) to it, it cooled for 30 minutes at -20 \*\*. Centrifugality was carried out on 12000-rpm conditions for 5 minutes after cooling, and solid settlings were obtained. Ethanol was added to the obtained settlings 70%, solid settlings were washed, and it dried under decompression after that. Thus, the solid which consists of a DNA by which obtained U was biotinylated was dissolved in the water of 108microl, and DNA concentration prepared the solution of 0. 01micro g/mu l. The length of generation DNA by PCR checked having applied DNA solution 8mul to 1. 0% agarose gel.

[0086]

[Work example 6]

the fixed 10x tailing buffer solution (1M sodium cacodylate (pH 7.6).) to the tailing and film of an oligonucleotide probe 10microl was carried out for 250 mMTris-HCl (pH 7.6) and 2mM dithiothreitol, and 200pmol mixing of 4microl and the probe was carried out for 100mMdTTP, and 10microl addition of 10mMCoCl<sub>2</sub> was carried out there, and it mixed to it. Furthermore 2microl addition of the terminal deoxy NUKUREOCHIIRU transferase (product made from TOYOBO) of 25 units / mul was done there, and full capacity was set to 100microl. After making this liquid react at 37 \*\* for 2 hours, 100micro of 1/1 mixed liquor l of phenol and chloroform extracted twice. In remaining extraction liquid, 10microl was added for 3M sodium acetate solution, 330microl was added for ethanol, stirring mixing was carried out, and it was neglected at -20 \*\* for 30 minutes. Then, the solid settlings obtained by carrying out centrifugality were washed by ethanol 70%. The obtained solid settlings were dried under decompression.

[0087] Thus, the obtained solid was dissolved in water 50mul, the solution of inner 42microl was heated at 65 \*\* for 5 minutes, and it cooled in ice promptly. The 10xSSC solution (1.5M sodium chloride, 0.19M sodium acid citrate, pH 7.0) of 1158microl was added and stirred in this solution. The blot of this solution was carried out to nylon membrane Dularon UV (made by Stratagene) every [ 100micro / l ] using Millipore MilliBlot-D. Furthermore, it is 10xSSC (sodium chloride and sodium citrate fluid washed, the SUTORA linker was used, and the 120000-micro joule exposure of the

ultraviolet rays was carried out.) about the well of MilliBlot-D.

[0088]The obtained film was washed for 15 minutes at 37 \*\* among 5xSSPE (0.9M sodium chloride, 50mM sodium dihydrogenphosphate (pH 7.4)), 5mM EDTA (pH 7.4) solution, and the solution that consists of SDS 0.5%. Then, it washed for 5 minutes in pure water. Thus, the obtained film was air-dried under the room temperature.

[0089]

[Work example 7]

0.5mM biotinylation-21-dUTP was not used in the gene amplification example 3 by PCR which does not use biotinylation-21-dUTP, but DNA which is operated like Example 3 and by which A was biotinylated was obtained except having set to 2.5mM concentration of dTTP added further.

[0090]

[Work example 8]

FPR1 and DRbetaAMP1 were used for the primer, and hybridization 1micro of chromosomal DNA [ which were extracted from the healthy Japanese donor ] g was applied to PCR of 30 cycles, and was amplified. [ of a DNA probe ] Alkaline denaturation of the fragmentation of 238 base pairs including the 2nd and 3rd hypervariable regions of the 2nd exon part of the amplified DRB gene was carried out, and 12 dots fixed to nylon membrane.

[0091]A film is cut off to 12 pieces, as a piece has one dot, First each piece with 12 sorts of oligonucleotide probes (F1, F2, F4, F7, F8, F9, F11, F120, F13, F123, F142, F143, two ng(s) each/ml) which carried out 32P label 6xSSC (sodium chloride, sodium acid citrate), 0.5%SDS, It was made to hybridize at 37 \*\* among 5x DENHARUTO liquid for 2 to 3 hours, and the film was washed on condition of the following and applied to autoradiography.

[0092]After this result is obtained, a film is processed at 37 \*\* for 15 minutes among 0.4MNaOH, then, 0.1xSSC (15mM sodium chloride and 1.9mM sodium acid citrate.) Among pH 7.0 and the solution which consists of SDS 0.01%, process at 37 \*\* for 15 more minutes, and an oligonucleotide probe is removed, It was made to hybridize by 12 sorts of other different oligonucleotide probes (F3, F10, F22, F29, F42, F44, F45, F46, F121, F122, F158, F52c), and the above-mentioned method. It adds to the above-mentioned oligonucleotide probe what cannot be thoroughly decided in the above-mentioned hybridization, and is F3. 0, F52, F141, F851, and F863 were used.



[0093]The washing solution presentation after hybridization and the washing temperature are as follows.

F1, F2, F7, F9, F29, F143, and F158:6xSSC (sodium chloride.) Sodium acid citrate, 0.1%SDS, 54 \*\*: F4, F8, F10, F22, F52, F52c, F121, F851, F863:6xSSC (sodium chloride, sodium acid citrate), 0.1%SDS, 57 \*\*: F11, F13, F30, F42, F120, F122, F123, F141, and F142:6xSSC (sodium chloride.) Sodium acid citrate, 0.1%SDS, 62 \*\*: F45, F46:3M tetramethylammonium chloride, 57 \*\*: Before washing a membranous fragment at the above-mentioned temperature, in all the cases of F3 and F44:3M tetramethylammonium chloride and the 62 \*\* above-mentioned washing, it had a penetrant remover, it was in them, and washed for 5 minutes under the room temperature to them. A result is shown in drawing 2.

[0094]

[Work example 9]

The film which fixed the hybridization probe which uses a probe fixed film is put into the plastic bag for hybridization, 2 ml of liquid [ 2 ml of ] for hybridization (50mM trischloride (pH 8.0), 3M tetramethyl ammoniumchloride, 2mMEDTA (pH 8.0), 5x DENHARUTO liquid, 0.1%SDS, 100microg denaturation salmon sperm DNA) was added there, and it heated for 50 minutes at 42 \*\*. Then, it amplified and 100ng (100microl) addition of the DNA which carried out the sign by biotinylation-21-dUTP or biotinylation-14-dATP in parallel further was carried out, and heating was continued for 3 hours, shaking at 42 \*\*.

[0095]Buffer solution was thrown away after hybridization, the film was taken out from the bag, and it washed twice the interval for 5 minutes under the room temperature in penetrant remover I (2xSSPE, 0.1%SDS). next, a film -- the penetrant remover II (50mM trischloride (pH 8.0) and 3M tetramethyl ammoniumchloride.) Under 2mMEDTA, 5x DENHARUTO liquid, and the room temperature in 0.1%SDS, it washed for 5 minutes, washed for 20 minutes at 58 \*\* among the penetrant remover II further, and washed for 5 minutes succeedingly under the room temperature in a 2xSSC (sodium chloride, sodium acid citrate) solution.

[0096]

[Work example 10]

The film which fixed the hybridization probe which uses a probe fixed film is put into the plastic bag for hybridization, It is 2 ml of hybridization

buffer solution (an ingredient and concentration as follows) there. 50mM trischloride (pH 8.0), 3M tetramethylammonium chloride, 2mMEDTA (pH 8.0), 5x DENHARUTO (0.1% ficoll, a 0.21% polyvinyl pyrrolidone, 0.1%BSA), 0.1%SDS, and 100 microg [/ml ] denaturation salmon sperm DNA2ml were added, and it heated for 50 minutes at 42 \*\*. Then, 100ng (100microl) addition of the DNA amplified there is carried out, and hybridization of the 3-hour heating was continued and carried out, shaking at 42 \*\*.

[0097]Throw away hybridization liquid after hybridization and a film is taken out from a bag, It washed twice the interval for 5 minutes under the penetrant remover I (2xSSPE (0.36M sodium chloride, 20mM next door acid water matter sodium, (pH 7.4)), EDTA (pH 7.4)) and the room temperature in 0.1%SDS. next, a film — the penetrant remover II (50mM trischloride (pH 8.0) and 3M tetramethyl ammoniumchloride.) Under 2mMEDTA, 5x Denhardt's solution, and the room temperature in 0.1%SDS, it washes for 5 minutes, washes for 20 minutes at 58 \*\* among the penetrant remover II further, and is 2xSSC (it washed for 5 minutes under sodium chloride and the room temperature in sodium citrate fluid.) succeedingly.

[0098]

[Work example 11]

the film after detection (PhotoGene™ Nucleic Acid Detection System by BRL is used) hybridization, and washing — TBS-Tween20 (100mM trischloride.) It washed for 1 minute under the room temperature in 150mMNaCl and 0.05% Tween20. Then, it processed for 50 minutes under the room temperature in the blocking solution (3%BSA, TBS-Tween20) of 0.75 ml per cm2 film.

[0099]The film was processed for 10 minutes under the room temperature in the liquid which diluted the solution of streptoavidin alkaline phosphatase combination 3000 times using TBS-Tween20. Then, it washed twice [ every / a 1 ml / per cm2 film / bottom of room temperature in TBS-Tween20 solution for / 15 minutes ]. Furthermore, it washed among the 10 time diluent of the last buffer solution, and under the room temperature for 1 hour. After placing the film on the Watt Mann 3MM filter paper and removing superfluous buffer solution, the film was placed into the development electrode holder. The detecting reagent was dropped at the film in an electrode holder, and the film was covered with the electrode holder. Made it react then for 2 hours, inserted an X-ray film or Hyper Film (Amersham), it was made to expose for 15 minutes, negatives were developed, and the result shown in Drawings

3 and 4 was obtained.

[0100]The mold of DR determined by the mold and probe of DR made clear on a mold division result serology target was compared, and it was shown in drawing 2 thru/or drawing 4, and Table 4 and 5. When the film which fixed sample DNA was made to hybridize a probe from this result, the result which shows the mold and subtype of DR which were serologically determined as the film which fixed the probe in the case of which [ at the time of carrying out by BURIDAIZU of the sample DNA ] was obtained. In the case of the mold which cannot be determined serologically, the mold has been determined.

[0101]

[Layout Table]

array number: -- length [ of 1 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OA3. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) The arrangement AGXAGXXGXC CACCCGGC. 18 array number: -- length [ of 2 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF10. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement XGGAAAGACG CGXCCAXAA. 19 array number: -- three length [ of (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OA1416. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement CAGGAGGAGA ACGXGCGCX. 19 array number: -- length [ of 4 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7)

arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF30. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement GACXXCCXGG AAGACGAGC. 19 array number: -- length [ of 5 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF44. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) The arrangement CGCGGCCCGC XXCXGXC. 18 array number: -- length [ of 6 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF45. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) The arrangement CCXCGGCCG CCXCGCX. 18 array number: -- length [ of 7 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF863. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) The arrangement GCXCXCACA GCCCCGXA. 18 array number: -- length [ of 8 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF851. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) The arrangement GCGGCCXGAX GCCGAGXA. 18 array number: -- length [ of 9 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as A3.

(8) The arrangement GCCGGGTGGA CAACTACT. 18 array number: -- length [ of 10 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F10.

(8) Arrangement TTATGGACGC GTCTTTCCA. 19 array number: -- length [ of 11 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as A1416.

(8) Arrangement AGCGCACGTT CTCCTCCTG. 19 array number: -- length [ of 12 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F30.

(8) Arrangement GCTCGTCTTC CAGGAAGTC. 19 array number: -- length [ of 13 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F44.

(8) The arrangement GAGCAGAAGC GGGCCGCG. 18 array number: -- length [ of 14 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F45.

(8) The arrangement AGCAGAGGCG GGCCGAGG. 18 array number: -- length [ of 15 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F863.

(8) The arrangement TACGGGGCTG TGGAGAGC. 18 array number: -- length [ of 16 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F851.

(8) The arrangement TACTCGGCAT CAGGCCGC. 18 array number: -- length [ of 17 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF1. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement GCXGGAAGA XGCAXCXAX. 19 array number: -- length [ of 18 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF2. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement CXCXGCGCAG GAACCGCAC. 19 array number: -- length [ of 19 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF3. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement GXCXGCGCAGX GXXGXCCAC. 19 array number: -- length [ of 20 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF4. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement CCXCXXGGXG AXAGAAGXA. 19 array number: -- length [ of 21 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic

acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a)  
living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name:(7)  
arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF7. X expresses T, when  
nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement CCXGGAAAGA CXCXXCXAX. 19 array number: -- length [ of 22  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a)  
living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name:(7)  
arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF8. X expresses T, when  
nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) The arrangement GGCCXGGXG GACACCXA. 18 array number: -- length [ of  
23 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of  
nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a)  
living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name:(7)  
arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF9. X expresses T, when  
nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement GGXGCGGXAX CXGCACAGA. 19 array number: -- length [ of 24  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a)  
living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name:(7)  
arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF11. X expresses T, when  
nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement CCAGXACXCC XCAXCAGGC. 19 array number: -- length [ of 25  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a)  
living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name:(7)  
arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF13. X expresses T, when  
nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement CGCXCGXCXX CCAGGAXGX. 19 array number: -- length [ of 26  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of

straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF52. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement XGGACAAXXA CXGCAGACA. 19 array number: -- length [ of 27 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF52c. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement GAAGXAXCXC XCCAGGAAC. 19 array number: -- length [ of 28 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF53. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement CXGAXCAGGX XCCACACXC. 19 array number: -- length [ of 29 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF120. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement AAGCGCAGGA GCXCCXCCX. 19 array number: -- length [ of 30 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF121. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement GCCXGXCXC CAGGAXGXC. 19 array number: -- length [ of 31 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide



DNA (6) origin (a) living thing name: -- feature [ of Homo sapiens (b) stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF122. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement CGCCXGXCXX CCAGGAAGX. 19 array number: -- length [ of 32 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF123. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement GCCXGXCXXC CAGGAGGXC. 19 array number: -- length [ of 33 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF142. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement CGGCCXGAXG CXGAGXACX. 19 array number: -- length [ of 34 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF143. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement GXXCCAGXGC XCCGCAGCA. 19 array number: -- length [ of 35 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF22. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement CAACAGGAGG ACXXGCGCX. 19 array number: -- length [ of 36 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock

name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF29. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement XGCACAGAGG CAXCXAXAA. 19 array number: -- length [ of 37 (1) arrangement ]: -- mold [ of 20 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF42. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement ACGGACXCCX CXXGGXGAXA. 20 array number: -- length [ of 38 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF46. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) The arrangement ACCGCGGCCC GCCXCXGC. 18 array number: -- length [ of 39 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF141. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement CAGGAGGAGX XCGXGCGCX. 19 array number: -- length [ of 40 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as OF158. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) The arrangement AGXACXCGGC GCXAGGCC. 18 array number: -- length [ of 41 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F1.

(8) Arrangement ATAGATGCAT CTTTCCAGC. 19 array number: -- length [ of 42 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F2.

(8) Arrangement GTGCGGTTCC TGCACAGAG. 19 array number: -- length [ of 43 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F3.

(8) Arrangement GTGGACAACT ACTGCAGAC. 19 array number: -- length [ of 44 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F4.

(8) Arrangement TACTTCTATC ACCAAGAGG. 19 array number: -- length [ of 45 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F7.

(8) Arrangement ATAGAAGAGT CTTTCCAGG. 19 array number: -- length [ of 46 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F8.

(8) The arrangement TAGGTGTCCA CCAGGGCC. 18 array number: -- length [ of 47 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F9.

(8) Arrangement TCTGTGCAGA TACCGCACC. 19 array number: -- length [ of 48  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F11.

(8) Arrangement GCCTGATGAG GAGTACTGG. 19 array number: -- length [ of 49  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F13.

(8) Arrangement ACATCCTGGA AGACGAGCG. 19 array number: -- length [ of 50  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F52.

(8) Arrangement TGTCTGCAGT AATTGTCCA. 19 array number: -- length [ of 51  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F52c.

(8) Arrangement GTTCCTGGAG AGATACTTC. 19 array number: -- length [ of 52  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F53.

(8) Arrangement GAGTGTGGAA CCTGATCAG. 19 array number: -- length [ of 53  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F120.

(8) Arrangement AGGAGGAGCT CCTGCGCTT. 19 array number: -- length [ of 54  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F121.

(8) Arrangement GACATCCTGG AAGACAGGC. 19 array number: -- length [ of 55  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F122.

(8) Arrangement ACTTCCTGGA AGACAGGCG. 19 array number: -- length [ of 56  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F123.

(8) Arrangement GACCTCCTGG AAGACAGGC. 19 array number: -- length [ of 57  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F142.

(8) Arrangement AGTACTCAGC ATCAGGCCG. 19 array number: -- length [ of 58  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F143.

(8) Arrangement TGCTGCGGAG CACTGGAAC. 19 array number: -- length [ of 59  
(1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of  
straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide  
DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock  
name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F22.

(8) Arrangement AGCGCAAGTC CTCCTGTTG. 19 array number: -- length [ of 60 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F29.

(8) Arrangement TTATAGATGC CTCTGTGCA. 19 array number: -- length [ of 61 (1) arrangement ]: -- mold [ of 20 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F42.

(8) Arrangement TATCACCAAG AGGAGTCCGT. 20 array number: -- length [ of 62 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F46.

(8) The arrangement GCAGAGGCGG GCCGCGGT. 18 array number: -- length [ of 63 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F141.

(8) Arrangement AGCGCACGAA CTCCTCCTG. 19 array number: -- length [ of 64 (1) arrangement ]: -- mold [ of 18 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as F158.

(8) The arrangement GGCCTAGCGC CGAGTACT. 18 array number: -- length [ of 65 (1) arrangement ]: -- mold [ of 25 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as FPR1.

[0102]T (C) means the mixture of T and C during arrangement.

(8) arrangement AGTGTCAATTT CTTCAAT (C) GGG ACCCA 25 array number: -- length [ of 66 (1) arrangement ]: -- mold [ of 20 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a). Living-thing name: Homo sapiens (b) The feature of stock name: (7) arrangement: In the text, it is indicated as DRbetaAMP1.

(8) Arrangement CGCTGCACTG TCAAGCTCTC. 20 array number: -- length [ of 67 (1) arrangement ]: -- mold [ of 27 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- the synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- Homo sapiens (b) feature [ of stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as GH46.

(8) Arrangement CCGGATCCTT CGTGTCCCCA. CAGCACG. 27 array number: -- length [ of 68 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- genomic DNA (6) origin (a) living thing name: -- feature [ of Homo sapiens (b) stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as O.K. 1406. X expresses T, when nucleic acid is RNA and U and nucleic acid are DNAs.

(8) Arrangement AACCAGGAGG AGAACGXGC. 19 array number: -- length [ of 69 (1) arrangement ]: -- mold [ of 19 (2) arrangement ]: -- number [ of nucleic acid (3) chains ]: -- single strand (4) topology: -- kind [ of straight-chain-shape (5) arrangement ]: -- synthetic oligonucleotide DNA (6) origin (a) living thing name: -- feature [ of Homo sapiens (b) stock name: (7) arrangement ]: -- in the text, it is indicated as K1406.

(8) Arrangement : GCACGTTCTC CTCCTGGTT 19

---

[Translation done.]